

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

Ökoloogia ja maateaduste instituut

Geograafia osakond

Magistritöö keskkonnatehnoloogias

**KÄÄRIMISJÄÄGI MÕJU
PÕLLUMAJANDUSLIKU ROHUMAA MULLA
ANTIBIOOTIKUMRESISTENTSUSGEENIDE
SISALDUSELE**

Kärt Kanger

Juhendajad: Hiie Nõlvak, PhD (Tartu Ülikool)

Professor Jaak Truu, PhD (Tartu Ülikool)

Kaitsmisele lubatud:

Juhendaja:

Osakonna juhataja:

Tartu 2015

Sisukord

Lühendite nimekiri	4
Sissejuhatus	5
1. Kirjanduse ülevaade.....	6
1.1. Antibiootikumid.....	6
1.1.1. Antibiootikumide keemilised omadused ja toimemehhanismid.....	6
1.1.2. Antibiootikumide funktsioon ja kasutamine	7
1.1.3. Antibiootikumid keskkonnas	7
1.2. Antibiootikumresistentsus (AR)	9
1.2.1. ARe toimemehhanismid ja ARGid.....	9
1.2.2. ARe ja ARGide levik keskkonnas	10
1.2.3. Põllumajanduse roll ARe levikus	11
1.3. Orgaanilise aine anaeroobne käitlemine	13
1.3.1. Anaeroobse lagundamise biokeemiline kulg	13
1.3.2. Anaeroobse lagundamise mõju ARele	14
2. Materjal ja meetodika	16
2.1. Katseala iseloomustus, väetamiskatse ülesehitus ja proovivõtt.....	16
2.2. Proovide keemiline analüüs	17
2.3. DNA eraldamine	17
2.4. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ja esmane andmeanalüüs	17
2.4.1. qPCR tingimused.....	18
2.4.2. qPCR andmete rühmitamine ja koopiaarvude leidmine	18
2.5. Statistiline analüüs	19
3. Tulemused.....	21
3.1. Orgaaniliste väetiste omadused	21
3.1.1. Veiseläga ja käärimisjäagi keemilised omadused	21
3.1.2. 16S rRNA ja ARGide sisaldus veiselägas ja käärimisjäagis	21
3.2. Põllumajandusliku rohumaa mullaproovide omadused.....	22
3.2.1. Mullaproovide keemilised omadused.....	22
3.2.2. 16S rRNA ja ARGide arvukuse ning ARGide osakaalu ajaline dünaamika rohumaa mullas	24
3.2.3. Väetustüüpidevahelised erinevused märklaudgeenide arvukuses ja osakaalus..	27
3.2.4. Märklaudgeenide arvukuse ja osakaalu seos mulla keemiliste omadustega	28
4. Arutelu ja järeldused	30

Kokkuvõte	34
The Effect of Digestate on the Antibiotic Resistance Genes in Agricultural Grassland Soil ..	36
Tänuavaldused	38
Kasutatud kirjandus	39
Lisa 1. Katseala meteoroloogilised andmed katseperioodil	46
Lisa 2. Antibiootikumide kasutus Vorbuse lüpsilaudas	46
Lisa 3. Mullaproovide keemilised omadused	47

Lühendite nimekiri

ANOVA	– ühesuunaline dispersioonanalüüs
AR	– antibiootikumresistentsus
ARG	– antibiootikumresistentsusgeen
Ca _{LL}	– laktaatlahustuv kaltsium
DPD	– defineeritud päevadoos
K _{LL}	– laktaatlahustuv kaalium
KA	– kuivaine
Mg _{LL}	– laktaatlahustuv magneesium
N _K	– Kjeldahli lämmastik
NH ₄ -N	– ammooniumlämmastik
NO ₃ -N	– nitraatlämmastik
NS	– niiskusesisaldus
OA	– orgaaniline aine
oKA	– orgaaniline kuivaine
P _{LL}	– laktaatlahustuv fosfor
qPCR	– kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon
rANOVA	– korduvmõõtmiste dispersioonanalüüs (<i>repeated measurement ANOVA</i>)
T1	– väetamata kontrollala
T2	– mineraalväetisega väetatud katseala
T3	– veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäägiga väetatud katseala
T4	– veiselägaga väetatud katseala

Sissejuhatus

Antibiootikume peetakse 20. sajandi farmaatsiatööstuse olulisimaks saavutuseks (Cytryn, 2013), mille panust bakteriaalsete infektsioonide vastu võitlemisel nii inim- kui veterinaarmeditsiinis on raske üle hinnata. Vaatamata antibiootikumide arvukatele kasulikele omadustele nagu mikroobsete haiguste ravi ning ennetus, kariloomade kasvu edendamine ja toiduohutuse suurendamine, on järjest rohkem tähelepanu pälvinud antibiootikumresistentsuse esinemine keskkonnas (Hao jt., 2014). Maailma Terviseorganisatsiooni hinnangul on väga tõenäoline, et multiresistentsete mikroobide laialdase leviku tõttu jõuab 21. sajandi meditsiinis antibiootikumidejärgsesse ajajärku, kujutades suurenenud ohtu nii inimeste kui loomade tervisele (WHO, 2014).

Kuigi valdav osa teadus- ja arendustööst on suunatud kliinilistes keskkondades leviva resistentsuse uurimiseks, on antibiootikumresistentsus looduslik fenomen. Rikkaimaks antibiootikumresistentsusgeenide reservuaariks keskkonnas peetakse mulda (Cytryn, 2013), mida iseloomustavad nii looduslik resistentsuse taustkontsentratsioon kui ka antropogeensed mõjutused. Oluline resistentsuse teket ja levikut hoogustav antropogeenne tegur on antibiootikumide kasutamine loomakasvatustes ja sealt pärinevate orgaaniliste jäätmete nagu sõnniku ja läga rakendamine põllumajandusväetisena (Heuer jt., 2011). Jätkusuutliku alternatiivina on välja pakutud orgaaniliste jäätmete anaeroobset lagundamist, mille saadusena tekkivat käärimisjääki saab kasutada väetisena (Weiland, 2010). Paraku pole käärimisjäägi täpset mõju mulla mikroobikooslusele piisavalt uuritud ning selle kasutamine väetisena võib olla riskiallikas antibiootikumresistentsuse levikul.

Käesoleva magistritöö eesmärk oli hinnata veiseläga anaeroobsel lagundamisel tekkiva käärimisjäägi väetisena kasutamise mõju antibiootikumresistentsusgeenide arvukusele ja osakaalule põllumajandusliku rohumaa mulla bakterikoosluses. Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga määrati bakteriaalse 16S rRNA ja viie antibiootikumresistentsusgeeni (*blaCTX-M*, *blaOXA2*, *tetA*, *sul1* ja *qnrS*) sisaldus rohumaa mullas, mida oli väetatud mineraalväetise, veiseläga või veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäägiga, võrdlusena kasutati väetamata kontrollala. Lisaeesmärkide hulka kuulusid mullaproovide ja nimetatud orgaaniliste väetiste keemiliste omaduste kirjeldamine ning orgaaniliste väetiste antibiootikumresistentsusgeenide sisalduse määramine.

1. Kirjanduse ülevaade

1.1. Antibiootikumid

Antibiootikumid on bioloogiliselt aktiivsed looduslikud, sünteetilised või poolsünteetilised ühendid, millel on antimikroobne toime (Kemper, 2008). Need pärivad mitmesuguste mikroorganismide – bakterite, arhede, viiruste, seente ja algloomade – kasvu ning on piisava kontsentratsiooni olemasolul mikroobidele letaalsed.

Antibiootikumid on looduslikku päritolu ja nende evolutsioon on kestnud ligikaudu miljard aastat (Baltz, 2008). Tuntuimad antibiootikumide biosünteesijad kuuluvad aktinobakterite hõimkonda aktinomütseetide rühma (Allen jt., 2010). Esimest korda suudeti looduslik antibiootikum (penitsilliin) isoleerida 1928. aastal. Sellele järgnesid streptomütsiini isoleerimine bakterist *Streptomyces griseus* aastal 1943 ja antibiootikumide laialdane kasutuselevõtt bakteriaalsete haiguste ravis (Kumar jt., 2012). Kaasajal on registreeritud sadu meditsiinilisi antibiootikumpreparaate (Kümmerer ja Henninger, 2003), mida toodetakse sünteetiliselt või looduslikke ühendeid modifitseerides (Kümmerer, 2009).

1.1.1. Antibiootikumide keemilised omadused ja toimemehhanismid

Antibiootikume iseloomustab lai keemiliste omaduste spekter, mis tuleneb erinevate funktsionaalrühmade esinemisest. Keemilise struktuuri alusel jagatakse antibiootikumid klassidesse, mille hulka kuuluvad aminoglükosiidid, β -laktaamid (sh. penitsilliinid ja tsefalosporiinid), tetratsükliinid, fluorokinoloonid, makroliidid, sulfoonamiidid, glükopeptiidid, linkosamiidid, trimetoprim ja teised (Kemper, 2008; Kümmerer, 2009). Paljud antibiootikumid on hüdrofiilsed, adsorbeeruvad pindadele katioonvahetuse, komplekseerumise ja vesiniksidemete kaudu ning nende happe dissotsiatsiooni konstant on lähedane mulla pH-ga (Chee-Sanford jt., 2009).

Antibiootikumid takistavad mikroorganismide elutähtsaid rakusiseseid protsesse. Nende toimemehhanismide hulka kuuluvad rakukesta biosünteesi, foolhappe biosünteesi, DNA replikatsiooni ja valgusünteesi inhibeerimine (Kumar jt., 2005). Uute sünteetiliste preparaatide sihtmärgiks on tihti rakumembraanid, takistades ainete transporti raku sees ja ainevahetust ümbritseva keskkonnaga (Li jt., 2015). Looduses kiirelt areneva resistentsuse tõttu on vajalik pidev teadus- ja arendustöö uute antimikroobsete ühendite avastamiseks, et tagada jätkusuutlik võitlemine bakteriaalsete haigustega (Gwynn jt., 2010; Coates jt., 2011; Spellberg jt., 2015).

1.1.2. Antibiootikumide funktsioon ja kasutamine

Antibiootikumide peamine looduslik funktsioon on konkurentsieelise andmine peremeesorganismile, takistades naabermikroobide elutegevust. Lisaks on täheldatud, et madalas kontsentratsioonis tekitavad antibiootikumid muutusi transkriptsioonis ja toimivad rakuvaheliste signaalmolekulidena (Allen jt., 2010). Bakteritel on kirjeldatud ka võime kasutada antibiootikume süsiniku ja lämmastiku allikana toitumiseks (Martinez, 2008; Allen jt., 2010).

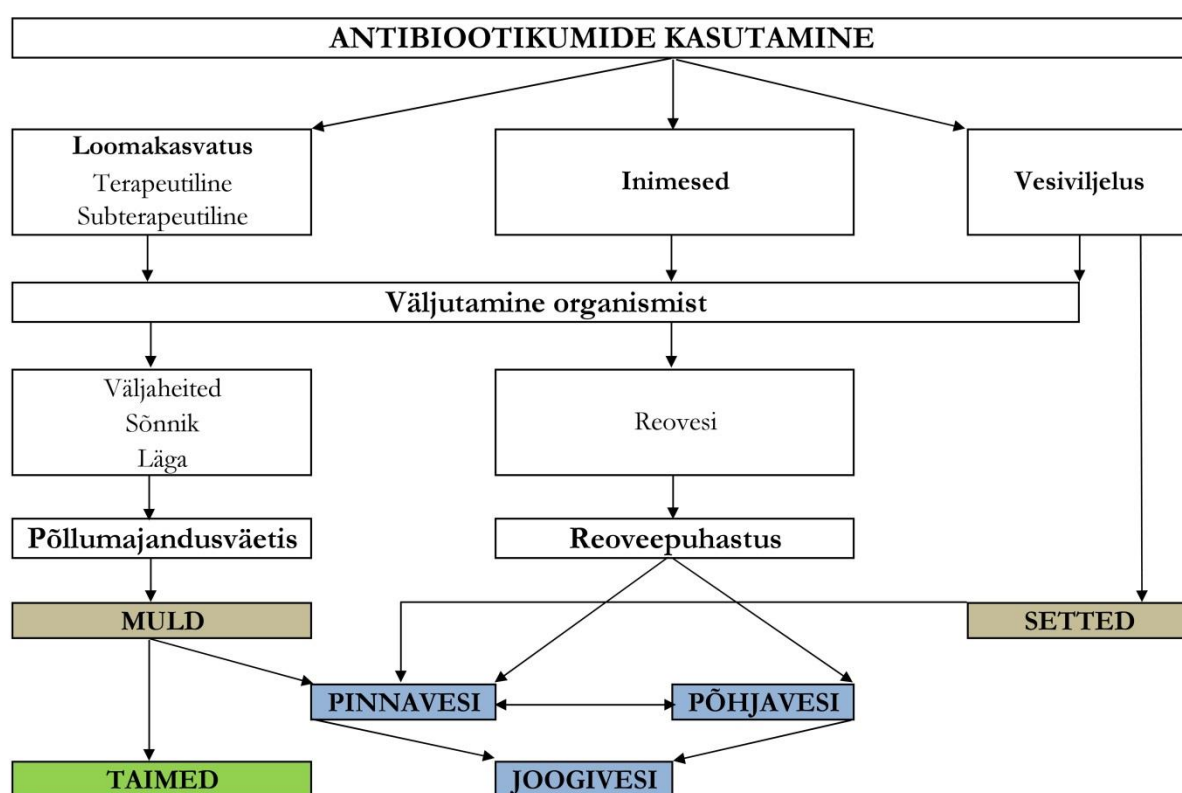
Enim tähelepanu on pälvinud antibiootikumide roll meditsiinis bakteriaalsete infektsioonide raviks, kuid ulatuslikult kasutatakse neid ka põllumajanduses. Levinud on antibiootikumide kasutamine veterinaarmeditsiinis, loomakasvatuses ja vesiviljeluskultuurides nii terapeutilise kui profülaktilise ühendina (Kümmerer, 2009). Lisaks on antibiootikumid levinud taimekasvatuses taimekahjurite tõrjumiseks (Kumar jt., 2005). Antibiootikumide kasutamine edendab kariloomade kasvu, leevendades globaalset toidupuudust ja suurendades toiduainete mikroobset ohutust, kuid ebaratsionaalselt suured antibiootikumide tarbimismahud võivad muutuda riskiallikaks nii keskkonnale kui inimestele, hoogustades resistentsete mikroobide levikut (Hao jt., 2014).

Hinnanguliselt on antibiootikumide globaalne kogutarbimine 100 000–200 000 tonni aastas (Wise, 2002), ulatudes 2010. aastal rohkem kui 73 triljoni üksikdoosini (Van Boeckel jt., 2014). Euroopa Liidus tarbiti 2013. aastal keskmiselt 22,4 DPD (defineeritud päevadoosi) antibiootikume 1000 elaniku kohta ööpäevas (ECDC, 2014), millele lisandus üle 8000 tonni veterinaarseid antibiootikume (2012. aasta andmed; EMA, 2014). Alates 2006. aastast on Euroopa Liidus keelatud antibiootikumide kasutamine kariloomade lihassmassi tõstmiseks (Euroopa komisjon, 2003), kuid USAs on selline praktika endiselt lubatud. *Union of Concerned Scientists* on leidnud, et 70% Ameerika Ühendriikide antibiootikumide kogutarbimisest (ligikaudu 16 200 tonni) kasutatakse loomakasvatuses (UCS, 2001). Paraku on veterinaarsete antibiootikumide globaalsed kasutusmahud selgelt dokumenteerimata, kuid suurimate tarbijate hulka kuuluvad USA ja Hiina, kellele järgnevad Korea, Prantsusmaa ning Jaapan (Kumar jt., 2012).

1.1.3. Antibiootikumid keskkonnas

Looduslik antibiootikumide taustkontsentratsioon keskkonnas on väga madal ning puuduvad arvandmed antibiootikumide hulgast väetamata mullas või vees (Kümmerer, 2009; Allen jt.,

2010). Peamiselt jõuavad antibiootikumid keskkonda inimtegevuse tagajärjel (Joonis 1). Üksnes väike osa manustatud antibiootikumidest omastatakse organismis, mistõttu suur hulk kasutatud ravimeid väljutatakse nii inim- kui loomorganismist keemiliselt muutumatu kujul või aktiivsete metaboliitidena, misjärel need jõuavad reovette või kogutakse sõnniku ja lägana loomakasvatustes. Enamasti ei suuda reoveepuhastussüsteemid ravimeid täielikult eraldada ning need jõuavad heitvee koosseisus looduslikesse veekogudesse (Kümmerer, 2009). Põllumajanduses kasutatavad antibiootikumid jõuavad keskkonda peamiselt sõnniku kasutamisel väetisena, aga ka õhu kaudu tolmuosakestena. Lisaks võivad antibiootikumid loodusesse sattuda ravimitööstusest ja ravimite vale käitlemise tagajärjel (Chee-Sanford jt., 2009).



Joonis 1. Antibiootikumide kasutamine ja levik keskkonnas (modifitseeritud Kumar jt., 2005). Pruuniga on tähistatud litosfääri, sinisega hüdroosfääri ja rohelisega taimkatte elemendid.

Keskkonnas mõjutavad antibiootikumide käitumist ja aktiivsust nii nende füüsikalise-keemilised omadused kui ka keskkonnaparametrid, näiteks mullatüüp ja ilmastikutingimused (Kemper, 2008). Tihti esineb adsorptsioon mullaosakestele, kirjeldatud on ka leostumist pinna- ja põhjavette, hüdrolüüsi ja ensümaatilist lagundamist hüdroksüül- ning oksüdatiivse dekarboksüleerimisreaktsiooniga (Thiele-Bruhn, 2003). Vähemal määral toimuvad fotolüütiline lagunemine ja taimne omastamine (Kümmerer, 2009). Keskkonda sattunud

antibiootikumid võivad mullas püsida kuid (Kümmerer, 2009) ning sattuda joogivee ja köögiviljade kaudu tagasi inimese toidulauale.

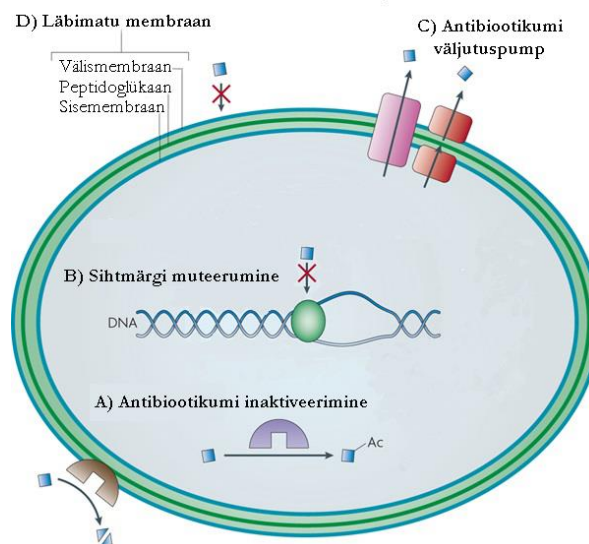
1.2. Antibiootikumresistentsus (AR)

Ulatuslik antibiootikumide kasutamine meditsiinis ja põllumajanduses põhjustab antibiootikumresistentsuse (AR) levikut mikroorganismide hulgas (Mitsubishi, 1969). Kuigi AR on looduslik nähtus ja resistentsusgeene on leitud isegi 30 000 aasta vanustest setetest (D'Costa jt., 2011), on just antibiootikumide laialdane kasutuselevõtt 1940. aastatel hoogustanud resistentsuse esinemist. Knapp jt. (2010) on dokumenteerinud antibiootikumresistentsusgeenide (ARG) akumulierimist mullas perioodil 1940–2008 ja leidnud, et alates 1970. aastatest on teatud ARGide kontsentratsioon mullas tõusnud rohkem kui 15 korda. ARe jätkuv levik ja kiire evolutsioon kujutavad endast otsest ohtu bakteriaalsete infektsioonide ravis, kuid mõjutavad ka looduslikku mikroobikooslust ja rikuvad mulla- ning veekeskkonna ökoloogilist tasakaalu (Martinez, 2008; Kumar jt., 2012).

1.2.1. ARe toimemehhanismid ja ARGid

Peamised raku tasemel mehhanismid, mis annavad mikroobile resistentsuse spetsiifilisele antibiootikumile, on (a) antibiootikumi ensümaatiline lagundamine või modifitseerimine, (b) antibiootikumi sihtmärgi muteerumine, (c) antibiootikumide väljutuspumbad ja (d) antibiootikumidele läbimatud membraanid (Joonis 2). Selle tulemusel ei pääse antibiootikum rakku, väljutatakse sealt või muudetakse inaktiivseks. Alternatiiv antibiootikumi modifitseerimisele on sihtmärgi muteerumine, mistõttu antibiootikum ei saa seonduda, kuid sihtmärgi normaalne funktsioon raku protsessides säilib. Näiteks spetsiifilised mutatsioonid DNA güraasis (Joonis 2) annavad resistentsuse fluorokinolonidele, häirimata DNA replikatsiooni, milles güraas osaleb (Allen jt., 2010).

Kaasaegsete molekulaarsete meetodite kasutuselevõtt ja metagenoomiuuringud on võimaldanud antibiootikumresistentsust kodeerivate ARGide massilist avastamist. Tuvastatud ARGide paljusus geenandmebaasides väljendab mikroobse resistentsuse mitmekülgsust, kuid lisaks ARe tagamisele võivad ARGid osaleda ka teistes raku füsioloogilistes protsessides (Martinez jt., 2015). Näiteks teatud antibiootikumide väljutuspumbad suudavad lisaks antibiootikumidele rakust välja viia ka raskmetalle ja muid toksilisi ühendeid (Allen jt., 2010). Enamus ARGid paiknevad genoomis mobiilsetel geneetilistel elementidel nagu plasmiidid, transposoonid ja integronid (Cytryn, 2013).



Joonis 2. Antibiootikumresistentsuse mehhanismid. Antibiootikum on kujutatud sinise ruuduna. A) Antibiootikumi inaktiveerimine lagundades või atsetüleerides; B) sihtmärgi muteerumine: muteerunud DNA güraas (roheline) viib läbi DNA replikatsiooni, kuid ei seonu antibiootikumiga; C) antibiootikumi väljutuspumpad: rakku sisenenud antibiootikum pumbatakse tagasi väliskeskkonda; D) läbimatu membraanid: osad antibiootikumid ei suuda läbida gram-negatiivse raku membraane ja peptidoglükaani (modifitseeritud Allen jt., 2010).

1.2.2. ARe ja ARGide levik keskkonnas

AR levib keskkonnas peamiselt antibiootikumresistentsete mikroobide vahendusel. Füüsilised tegurid nagu tuul ja vesi kannavad resistentseid mikroobe looduses edasi, samuti liiguvad resistentsed mikroobid loomade, lindude ja inimeste kaudu (Allen jt., 2010). ARGid levivad vertikaalselt emasorganismilt tütarorganismile, aga ka horisontaalselt eri liikide vahel (Götz ja Smalla, 1997). Horisontaalne geenitriiv mikroobikoosluses toimub transformatsiooni, transduktsiooni või konjugatsiooniga, mille käigus omandatakse vastavalt väliskeskkonnas esinev vaba DNA, bakteriofaagi koostises olev DNA või lõik rakuga füüsilises kontaktis oleva naaberraku DNAST (Cytryn, 2013). Rohkelt tähelepanu on pälvinud ARGide horisontaalne ülekandumine patogeensetele organismidele, sest nii saavad tekkida ravile allumatud mikroobitüved. Mitme ARGi omandamisel tekivad multiresistentsed patogeendid, mida peetakse kaasaegse meditsiini suurimateks väljakutseteks (Cytryn, 2013).

ARGide horisontaalset levikut piiravad mitmed pudelikaelad: vajalik on doonor- ja retsipientraku füüsiline koosseksisteerimine, et toimuks DNA ülekanne. Samuti on ARGid retsipientrakule metaboolseks koormuseks, mistõttu mitme sarnase funktsiooniga ARGi hankimine pole rakule kasulik (Martinez jt., 2015). Seega sõltub ARGide levik erinevatest

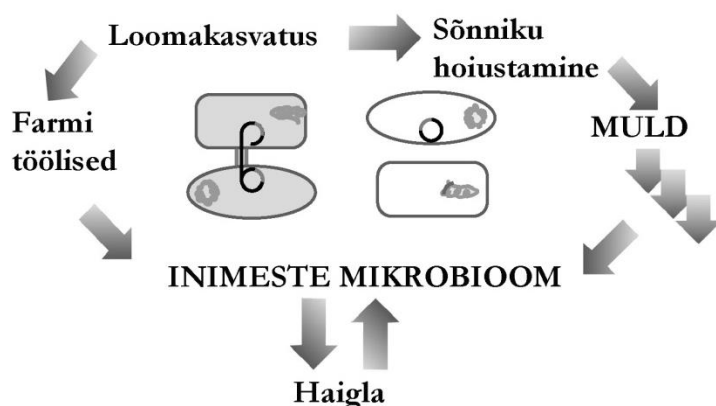
teguritest, mille alusel saab määrata ARGide kuulumise erinevatesse riskiklassidesse. Martinez jt. defineerisid 7 riskipotentsiaali klassi (*resistance readiness condition* ehk *RESCon*), mis arvestavad ARGi primaarjärjestust, funktsiooni, paiknemist genoomis, resistentsusmehhanismi ja peremeesringi (Martinez jt., 2015). Kõrgeima riskipotentsiaaliga ARGid (*RESCon 1*) asuvad mobiilsetel geneetilistel elementidel, nende peremeesringi kuuluvad inimpatogeensed ja on näidatud, et nende tõttu ei allu bakteriaalne infektsioon antibiootikumravile.

1.2.3. Põllumajanduse roll ARe levikus

Kaasaegne intensiivne põllumajandus on oluliselt panustanud ARe kiirsesse arengusse ja levikusse. Massiline antibiootikumide kasutamine loomakasvatustes, et ravida ning ennetada mikroobseid haigusi ja samuti edendada kariloomade kasvu, hoogustab resistentsete mikroobide teket farmides. 30–90% manustatud veterinaarsete antibiootikumide doosist väljutatakse loomorganismist keemiliselt muutumatuna (Sarmah jt., 2006), mille tulemusel jõuavad bioloogiliselt aktiivsed antibiootikumid sõnnikusse ja lágasse. Viimaste kasutamine põllumajandusliku väetisena on levinud praktika kõikjal maailmas ja nii viiakse mulda toitaineid, aga ka antibiootikumid, antibiootikumresistentsed mikroobid ja ARGid (Heuer jt., 2011). Subterapeutilises kontsentratsioonis antibiootikumide jäägid tekitavad selektiivse surve ARGidele, kiirendades nende horisontaalset levikut mikroobikoosluses ja suurendades ARe hulka nii mullas kui vesikeskkonnas. Loodusest võib resistentsus levida edasi inimeste mikrobioomi nii otseselt kui kaudselt teid pidi (Joonis 3). Otsekontaktide hulka kuuluvad kokkupuutumine resistentsed mikroobe kandvate loomade, nende väljaheidete, saaduste ja neid ümbritseva keskkonnaga. Kaudselt võib resistentsus jõuda inimeseni joogiveest, aerosooliosakestena õhu vahendusel ja mikroobidega saastunud toidu kaudu, mõjutades organismi loomulikku mikroobikooslust (Heuer jt., 2011).

Mitmed uuringud on käsitlenud kultiveeritavate antibiootikumresistentsete mikroobide arvukuse muutusi läga või sõnnikuga väetatud mullas. Sengeløv jt. (2003) näitasid tetratsükliinresistentsuse lühiajalist suurenemist sealäga väetatud mullas. Kobashi jt. (2005) kirjeldasid antibiootikumresistentsete bakterite arvukuse suurenemist mullas, mida väetati tahke seasõnnikuga 40 t ha⁻¹ pidevalt kümne aasta jooksul. Ghosh ja LaPara (2007) leidsid, et agronoomiliselt sobiva väetismahu korral ei suurenda sõnniku laotamine põllule antibiootikumresistentsete bakterite arvukust mullas, kuid liiga suurte koguste korral võib väetamine viia ARe vohamisele kohalikus mikroobikoosluses. Pourcher jt. (2014) kirjeldasid muutuseid mulla *Escherichia coli* populatsioonis väetamisel antibiootikumjääke sisaldava

kanasõnnikuga ja näitasid, et resistentne *E. coli* säilis mullas vähemalt kolm kuud pärast väetamist. Loetletud uurimused näitavad väetamise potentsiaalsed mõju mulla mikroobikooslusele ja resistentsusele.



Joonis 3. ARGide levik mobiilsete geneetiliste elementide vahendusel loomakasvatusest inimeste mikrobiomi. Mitmekordsed nooled mullast inimeseni tähistavad erinevate levikuradade eksisteerimist (modifitseeritud Heuer jt., 2011).

Molekulaarmedetodite võidukäik on lisaks kultiveeritavate bakterite uurimisele võimaldanud määrata ka ARGide koguarvu keskkonnaproovides. Heuer jt. (2008) mõõtsid sulfoonamiidide resistentsusgeenide *sul1* ja *sul2* sisaldust sulfoonamiide sisaldava sõnnikuga väetatud mullas ning leidsid, et väetamine viis mulda suures koguses uuritavaid gene, mille kontsentratsioon langes väetamise järgselt eksponentsiaalselt, kuid ARGid püsisid mullas kuue kuu jooksul katseperioodi lõpuni. Sarnaselt eelnimetatuga täheldasid Munir ja Xagorarak (2011) *sul1* ja tetratsükliinresistentsusgeenide *tetW* ning *tetO* kontsentratsiooni olulist tõusu liivsavimulla väetamisel sõnnikuga, kuid saviliiva mullatüübiga katsealal väetamise mõju ei avaldunud. See näitlikustab keskkonningimuste mõju ARGidele ja nende levikule, mis võib osaliselt seletada vasturääkivate uurimistulemuste esinemist teaduskirjanduses (Heuer jt., 2011).

Loomakasvatustes kasutatavad sõnniku ja läga käitlustehnoloogiad võivad mõjutada väetisega põllule jõudvate antibiootikumide, resistentsete mikroobide ning ARGide hulka. Levinud meetodid enne põllule laotamist on jäätmete hoiustamine sõnnikuhoidlas või aunades ning komposteerimine (Storteboom jt., 2007). Näidatud on, et sõnniku pikaaegsel ainetöötlemisel väheneb tetratsükliinresistentsusgeenide *tetW* ja *tetO* sisaldus (Storteboom jt., 2007). Chen jt. (2010) kirjeldasid erütromütsiinresistentsusgeenide dünaamikat sealäga töötlemisel aeroobses ülesvoolulises biofiltris ja tuvastasid *ermX* geeni efektiivse ärastuse, kuid teisi uuritud gene

(*ermB*, *ermF*, *tetG*) töötlus oluliselt ei mõjutanud. Jätksuutliku alternatiivina on tähelepanu pälvinud sõnniku ja läga anaeroobne käitlemine enne põllule kandmist (vt. peatükk 1.3.2).

1.3. Orgaanilise aine anaeroobne käitlemine

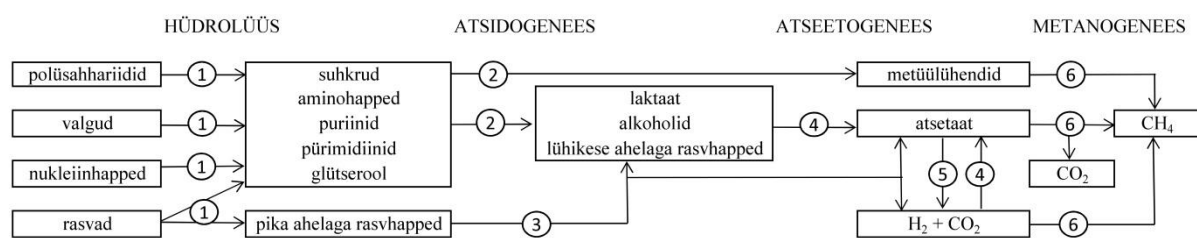
Biomassi, sh. läga ja sõnniku anaeroobne lagundamine on mitmeetapiline mikroobne protsess, milles osalevad erinevad mikroorganismide grupid. Looduses toimuvad anaeroobsed laguprotsessid hapnikuvaestes keskkondades nagu märgalad, setted ja mäletsejate seedekulgla (Insam jt., 2010), kuid sama protsessi on tööstuslikult rakendatud juba 1950. aastatest prügilagaasi ja biogaasi tootmiseks (Divya jt., 2015). Tööstusliku anaeroobse lagundamise traditsioonilised toorained on põllumajanduslik läga ja reoveemuda, millele suurema tootlikkuse saavutamiseks lisatakse mitmesuguseid kosubstraate nagu rohtsed energiakultuurid ja biojäätmek (Weiland, 2010).

Biomassi anaeroobse lagundamise tulemusel tekivad kõrge metaanisisaldusega (ligikaudu 2/3 mahust) energeetiliselt väärtuslik biogaas ja käärimisjääk, mille kogus ning kvaliteet sõltuvad peamiselt kasutatud toorainest (Weiland, 2010). Biogaasi kasutatakse enamasti energia ja sooja tõhusaks koostootmiseks, kuid puhastatud biogaasi ehk biometaanit saab kasutada ka mootorikütusena ja maagaasi alternatiivina nii tööstuses kui kodumajapidamistes (Poeschl jt., 2010). Biogaasi tootmise kõrvalprodukt on käärimisjääk, mis on kõrge mineraalainete sisalduse tõttu sobilik põllumajandusväetis. Käärimisjäägi positiivsete omaduste hulka kuuluvad vähenenud lõhn ning patogeenide osaline inaktivatsioon (Weiland, 2010). Sarnaselt biogaasiga sõltub ka käärimisjäägi täpne keemiline koostis kasutatud toorainetest. Seetõttu võivad käärimisjäägi koosseisus mulda jõuda mitmesugused füüsilised, keemilised ja bioloogilised ühendid, sh. plastik, raskmetallid, ravimijäägid ja lagundamise protsessis ellu jäänud patogeenid (Al Seadi jt., 2013). Selleks, et realiseerida käärimisjäägi potentsiaal põllumajandusväetisena, tuleb kasutada kvaliteetset toorainet, teostada käärimisjäägi kvaliteedikontroll ja vajadusel rakendada järeltöötlust (Al Seadi jt., 2013).

1.3.1. Anaeroobse lagundamise biokeemiline kulg

Anaeroobne lagundamine on kompleksne biokeemiline protsess, mille võib tinglikult jagada neljaks etapiks: hüdrolyüs, atsidogenees, atseetogenees ja metanogenees (Joonis 4). Hüdrolyüsi käigus lõhutakse suured biopolümeerid väiksemateks koostisosadeks, mis seejärel muundatakse erinevateks alkoholideks ja orgaanilisteks hapeteks. Hüdrolyütiliste ja atsidogeneetiliste organismide hulka kuuluvad anaeroobsed bakterid ja seened, teiste hulgas

on esindatud perekonnad *Clostridium* ja *Selenomonas* (Insam jt., 2010). Atseetogeneetilised organismid käärivad atsidogeneesi produktid edasi atsetaadiks, formiaadiks, molekularseks vesinikuks ja süsinikdioksiidiks, mis on metanogeneesi substraadid. Atseetogeneetilised bakterid kuuluvad enamasti hõimkonda *Firmicutes*, näiteks *Acetobacterium woodii* ja *Clostridium aceticum* (Weiland, 2010). Anaeroobse lagundamise viimases etapis toodavad metanogeensed arhed metüülühenditest, atsetaadist või süsinikdioksiidist ja vesinikust metaani, mis on biogaasi energiakandja. Seni kirjeldatud metanogeenid kuuluvad seltsidesse *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales* ja *Methanosarcinales* (Insam jt., 2010). Lisaks nimetatud etappidele toimuvad orgaanilise aine anaeroobsel lagundamisel ka pika ahelaga rasvhapete β -oksüdatsioon ja võimalik on atsetaadi oksüdeerumine (Insam jt., 2010). Anaeroobse lagundamise toimumiseks on vajalik kõigi mikroobigruppide tihe koostöö, sest võrreldes aeroobse lagundamisega on protsess termodünaamiliselt ebaefektiivsem ja mikroobidele madala energiasisaldusega (Schink, 1997).



Joonis 4. Anaeroobse lagundamise etapid: 1) biopolümeeride hüdrolüüs, 2) atsidogenees, 3) pika ahelaga rasvhapete β -oksüdatsioon, 4) atseetogenees, 5) atsetaadi oksüdatsioon, 6) metanogenees (modifitseeritud Insam jt., 2010).

1.3.2. Anaeroobse lagundamise mõju ARele

Anaeroobne lagundamine on üks põllumajanduslike jäätmete tötlusviise, milles nähakse võimalust piirata antibiootikumresistentsuse levikut (Beneragama jt., 2011). Abdul ja Lloyd (1985) on näidanud, et anaeroobsel lagundamisel väheneb sealägas antibiootikumresistentse *E. coli* arvukus. Sarnaselt eelnimetatuga leidsid Beneragama jt., et tsefasoliin-resistentsete bakterite arvukus väheneb 99,89–99,99% (2011) ja multiresistentsed bakterid eemaldatakse täielikult (2013) tsefasoliini sisaldava veisesõnniku, veiseläga ja jääkpiima termofiilsel (55°C) lagundamisel. Samade toorainete mesofiilsel (37°C) lagundamisel oli resistentsuse eemaldusefektiivsus madalam, samuti toodeti vähem biogaasi ja metaani (Beneragama jt., 2013). Ka Resende jt. (2014b) on näidanud, et veisesõnniku muutuva temperatuuriga mesofiilne lagundamine vähendab erinevate bakterigruppide arvukust, kuid ei eemalda

multiresistentseid baktereid täielikult. Lisaks säilisid käärimisjäägis patogeenide DNA ja ARGid *ermB*, *aphA2* ning *bla_{TEM-1}* (Resende jt., 2014a).

Vastupidiselt eelpool nimetatule on avaldatud ka tulemusi, kus anaeroobne lagundamine ei vähendanud ARGide arvukust (Chen jt., 2010) või teatud juhtudel koguni tõstis nende kontsentratsiooni (Ghosh jt., 2009; Ma jt., 2011). Seejuures avaldub anaeroobse lagundamise mõju spetsiifilistele ARGidele erinevalt (Ghosh jt., 2009; Ma jt., 2011) ja korduvalt on näidatud ARGide ärastusefektiivsuse kasvu kõrgemal temperatuuril (Ghosh jt., 2009; Diehl ja LaPara, 2010; Ma jt., 2011; Beneragama jt., 2013). Paraku on termofiilse temperatuuri hoidmine kõrge energiatarbega protsess, mistõttu tihti eelistatakse mesofiilset lagundamist. Lisaks mõjutavad resistentsete mikroobide ellujäämist viibeaeg anaeroobses bioreaktoris, pH, toitainete olemasolu ja mikroobne konkurents (Beneragama jt., 2013). Antibiootikumresistentsuse täiendavaks kontrollimiseks on pakutud välja tooraine eeltöötlus- ja käärimisjäägi järeltööstustehnoloogiaid, sh. kuumutamist, osoneerimist ja ladestamist stabilisatsioonibasseinides (Bernet ja Béline, 2009; Di Iaconi, 2012), mille rakendamisega kaasnevad aga täiendavad majanduskulud.

2. Materjal ja metoodika

2.1. Katseala iseloomustus, väetamiskatse ülesehitus ja proovivõtt

Põllumajandusliku rohumaa väetamiskatse toimus Eesti Maaülikooli Eerika katsejaamas Tähtvere vallas Tartumaal (58°23'32" N, 26°41'31" E, 60 m merepinnast) 152 päeva jooksul aprillist septembrini 2013. aastal. Katsealal on varasemalt kasvatatud teravilja, kuid 2008. aastal rajati sinna kõrreliste rohumaa, mille taimestikus domineerisid katse teostamise ajal aasnurmikas (*Poa pratensis* L.), punane aruhein (*Festuca rubra* L.) ja väetamata katselappidel ka valge ristiku looduslik väikeseleheline vorm (*Trifolium repens* L.). Aastatel 2012–2014 kasutati katseala kindlate piirkondade väetamiseks vastavalt mineraalväetist, veiseläga või veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjääki. Rohumaa asub näivleetunud mullal, mille huumushorisoni lõimis on saviliiva ja kerge liivsavi vahepealne (FAO, 2006). Piirkonna meteoroloogilised näitajad registreeriti elektroonilises ilmajaamas *Metos Compact* (Pessl Instruments, Weiz, Austria): katseperioodi keskmine õhutemperatuur oli 13,7°C ja sademete hulk aprillist septembrini 294 mm (Lisa 1).

105,6 m² suurune katseala jagati neljaks väetamistsooniks, mis igaüks koosnesid kolmest eraldi paigutatud 8,8 m² suurusest katselapist. Väetistena kasutati

- 1) mineraalset lämmastikväetist (NH₄NO₃) (T2),
- 2) veiseläga (T4),
- 3) veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjääki (T3),
- 4) kontrolltsoonile väetisi ei lisatud (T1).

Väetised laotati samasse väetamistsooni kuuluvate katselappide pinnale käsitsi võrdsete annustena (6 g N m⁻²) eksperimendi 2. (9.), 48., ja 97. päeval. Esimene väetamine toimus tehnilistel põhjustel kahes osas: T4 alasse kuuluvad katselapid väetati eksperimendi 2. päeval ja T2 ning T3 alasse kuuluvad katselapid väetati eksperimendi 9. päeval. Orgaaniliste väetiste täpne annus arvutati veiseläga ja käärimisjäägi ammooniumlämmastiku sisalduse alusel (vt. peatükk 3.1.1). Nii töötlemata veiseläga kui veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjääk toodi vahetult enne väetamist vastavalt Vorbuse lüpsilauda sõnnikuhoidlast Tartumaalt või Oisu biogaasijaamast Järvamaalt. Vorbuse laudas on kokku 674 loomakohta lehmadele ja 940 kohta noorloomadele (Keskkonnaamet, 2008), kellele vajadusel rakendatakse antibiootikumteraapiat (Lisa 2). Oisu biogaasijaam kasutatab veiseläga, veisesõnniku, heina ja silo mesofiilset (37–38°C) kooskäaritamist soojuse ja elektrienergia tõhusaks koostootmiseks aastase toodanguga 8,4 GWh elektrit ja 8,4 GWh soojust (Nelja Energia, 2014).

Mulla komposiitproovid (200 g) koguti igale väetamisele eelneval ja järgneval päeval iga katselapi pindmisest kihist (0–10 cm) mullapuuriga, millega sooritati keskmiselt 20 torget katselapi kohta. Lisaks koguti vaheproovid katse 56., 71. ja 89. päeval ning vastavalt üks kuu (126. päeval) ja kaks kuud (152. päeval) pärast viimast väetamist. Veiseläga ja käärimisjäägi proovid (250 g) koguti vahetult enne põllule kandmist. Mulla, läga ja käärimisjäägi osaproovid (30 g) säilitati vastavalt +4°C ja –20°C juures kuni proovide keemilise analüüsi ja DNA eraldamiseni.

2.2. Proovide keemiline analüüs

Mulla, veiseläga ja käärimisjäägi proovide keemiline analüüs toimus Eesti Maaülikooli Taimebiokeemia laboratooriumis vastavalt standardmeetoditele (APHA, 1989). Mullaproovidest määrati kuivaine (KA), orgaanilise aine (OA), niiskuse (NS), Kjeldahli lämmastiku (N_K) ja laktaatlahustuva fosfori (P_{LL}) sisaldus ning pH_{KCl} . Lägast ja käärimisjäägist määrati lisaks ka orgaanilise kuivaine (oKA), ammooniumlämmastiku (NH_4-N), nitraatlämmastiku (NO_3-N), laktaatlahustuva kaaliumi (K_{LL}), laktaatlahustuva kaltsiumi (Ca_{LL}) ja laktaatlahustuva magneesiumi (Mg_{LL}) sisaldus. Välikatse läbiviimises ja proovide keemilisel analüüsil antud töö autor ei osalenud.

2.3. DNA eraldamine

Mulla, veiseläga ja käärimisjäägi proovidest eraldati DNA *PowerSoil DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA) komplektiga vastavalt tootja juhendile. Rakkude lüüsimiseks kasutati homogenisaatorit *Precellys® 24* (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Prantsusmaa) programmiga 5000 rpm 20 sekundi jooksul. Eraldatud DNA kontsentratsioon ja kvaliteet määrati spektrofotomeetriliselt masinaga *Infinite M200* (Tecan AG, Grödig, Austria). Eraldatud DNA säilitati –20°C juures.

2.4. Kvantitatiivne polümeraasi ahelreaktsioon ja esmane andmeanalüüs

Kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga (*quantitative Polymerase Chain Reaction* qPCR) määrati bakteriaalse 16S rRNA ja viie ARGi sisaldus uuritavates proovides. Valitud ARGid kodeerivad resistentsust erinevatele antibiootikumirühmadele: *tetA* annab resistentsuse tetratsükliinidele (kodeerib antibiootikumi väljutuspumpa), *sulI* sulfoonamiididele (kodeerib modifitseeritud dihidropteroadi süntaasi foolhappe sünteesirajas), *qnrS* fluorokinoloonidele (kaitseb DNA güraasi replikatsioonil) ja *blaCTX-M* ning *blaOXA2* β-laktaamidele (hüdrolüüsivad β-laktaame). Kuna sulfoonamiidid ja fluorokinoloonid on sünteetilised

antibiootikumid, mis looduslikult ei esine, esindavad geenid *sulI* ja *qnrS* inimtegevuse tagajärjel tekkinud resistentsust.

2.4.1. qPCR tingimused

qPCR teostati reaalaaja PCR süsteemiga *RotorGene® Q* (QIAGEN, Foster City, CA, USA), kasutades *RotorGene Series Software version 2.0.2* (Qiagen) tarkvara. Reaktsioonisegu valmistati lõppmahuga 10 µl ja sisaldas 5 µl *Maxima SYBR Green Master Mix* reagenti (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, Waltham, USA), optimeeritud kontsentratsiooniga geenispetsiifilisi praimereid, 1 µl eraldatud DNAd ja ülejäänud mahu steriliseeritud destilleeritud vett. Märklaudgeenide spetsiifilised praimerid, optimeeritud reaktsioonitingimused ja optimeeritud qPCR amplifikatsiooniprogrammid on toodud tabelis 1. Kvantifitseerimiseks kasutati märklaudgeene sisaldavate plasmiidide lähtelahuseid kontsentratsiooniga 10^9 geenikoopiat μl^{-1} (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Saksamaa), millest valmistati standardlahjendused vahemikus 10^8 kuni 25 koopiat μl^{-1} . Standardlahjendusi kasutati qPCR kvantifitseerimisstandardi koostamiseks, mis toimus igale geenile optimeeritud tingimustel sarnaselt keskkonnaproovidega (Tabel 1). qPCR amplifikatsioonireaktsioonile järgnes sulamiskõvera määramine vahemikus 70°C kuni 95°C (0,35°C/3 s) pideva fluorestsentssignaali mõõtmisega. Kõik proovid amplifitseeriti kolmes korduses ja igale mõõtmisele lisati negatiivne kontroll võimaliku DNA saastuse tuvastamiseks reagentides. Negatiivne kontroll sisaldas kõiki reaktsiooni komponente välja arvatud märklaud-DNA.

2.4.2. qPCR andmete rühmitamine ja koopiaarvude leidmine

Iga qPCR amplifikatsioonireaktsiooni analüüsiti *RotorGene Series Software version 2.0.2* tarkvaraga, arvestades paralleelide amplifikatsioonikõverate ühtsust ja sulamiskõverate paiknemist ning kuju. qPCR efektiivsust analüüsiti täiendavalt programmiga *LinRegPCR version 2012.3* (Ruijter jt., 2009). Ühesuunalise dispersioonanalüüsiga (ANOVA) tuvastati eri väetamistsooni kuulunud proovide amplifikatsiooniefektiivsuste statistiliselt oluline erinevus üksteisest ($p < 0,05$), mille alusel defineeriti kuus rühma proovide järgnevas analüüsiks: 1) väetamata kontroll, 2) mineraalväetisega väetatud, 3) käärimisjäägiga väetatud, 4) veiselägaga väetatud, 5) käärimisjääk, 6) veiseläga. Sihtmärkgeeni koopiaarvu leidmiseks arvutati uuritava proovi (A) ja vastava kvantifitseerimisstandardi eri punktide (B) vaheline kordsusaste vastavalt valemile [1] (Ruijter jt., 2009).

$$[1] \text{ Kordsusaste} = N_{0,A} / N_{0,B} = (N_{t,A} / E_A^{Ct,A}) / (N_{t,B} / E_B^{Ct,B})$$

N_0 – amplikonide A ja B algkontsentratsioon fluorestsentsühikutes

E – vastavate amplikonide amplifikatsiooniefektiivsus

N_t – fluorestsentsi läviväärtus

C_t – läviväärtuse saavutamiseks kulunud amplifikatsioonitsüklite arv

Uuritavas proovis sisalduva geeni koopiaarv saadi leitud kordsusastme korrutamisel vastava standardlahjenduse kontsentratsiooniga. Uuritava geeni lõplik koopiaarv igas proovis leiti kvantifitseerimisstandardi eri punktide alusel saadud koopiaarvude ja korduvmõõtmiste geomeetrilisel keskmistamisel. Koopiaarvud taandati proovi kuivainesisaldusega ja esitati kujul geenikoopiat $g^{-1} KA^{-1}$. Ühte väetustsooni kuulunud kolme katselapi tulemused esitati väetustsooni aritmeetilise keskmisena. Lisaks arvutati ARGide osakaal mulla, veiseläga ja käärimisjäägi bakterikoosluses, taandades ARGi arvukuse (A) 16S rRNA arvukusega (B) vastavalt valemile [1].

2.5. Statistiline analüüs

Tulemuste statistiline analüüs sooritati tarkvaraga *Statistica 7.0* (StatSoft, Inc., USA). Shapiro-Wilk's W-testi alusel tuvastati normaaljaotuse puudumine uuritud geenide koopiaarvudes ($p < 0,05$), mistõttu kasutati mitteparameetrilisi analüüsimeetodeid ja andmete geomeetrilist keskmistamist. Spearmani astak-korrelatsioonanalüüsiga testiti erinevate geenide dünaamika korreleerumist ühe väetamistsooni piires, samuti testiti konkreetse geeni arvukuse ja osakaalu dünaamika korreleerumist erinevates väetamistsoonides ning mulla keemiliste parameetrite korreleerumist uuritud geenide arvukuse ja osakaalu dünaamikaga. Mulla keemiliste parameetrite ning geenide arvukuse ja osakaalu erinevust vastavalt väetustüübile testiti korduvmõõtmiste dispersioonanalüüsil (*repeated measurement ANOVA* rANOVA), millele eelnes andmete normaliseerimine. Geenikoopiate arvukuse ja mulla keemiliste parameetrite normaliseerimiseks kasutati naturaallogaritmimist, ARGide osakaalude normaliseerimiseks kasutati funktsiooni $\arcsin\sqrt{\text{osakaal}}$. Konkreetsete väetamistsoonide vahelised erinevused tuvastati Tukey HSD järeltestiga.

Tabel 1. qPCR praimerid ja amplifikatsiooni tingimused.

Sihtmärk- geen	Praimerid	Praimeri primaarjärjestus	Amplikoni suurus (bp)	Praimeri kontsentratsioon (μ M)	Praimeri kirjandusviide	qPCR programm
16S rRNA	517F 1028R	GCCAGCAGCCGCGGTAA CGACARCCATGCASCACCT*	530	0,3 0,3	Liu jt., 2007 Dethlefsen jt., 2008	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsüklit: 95°C 30 s, 60°C 45 s, 72°C 45 s
<i>blaCTX-M</i>	CTX-M UP CTX-M LP	ACCAAYGATATYGCGGTGAT* ACATCGCGYCGGCMRTCT*	101	0,3 0,3	Muudetud Colomer-Lluch jt., 2011	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsüklit: 95°C 15 s, 56°C 30 s, 72°C 30 s
<i>blaOXA2</i>	blaOXA-2F blaOXA-2R	TCTTCGCGATACTTTYCTCCA* ATCGCACAGGATCAAAAACC	177	0,4 0,4	Szczepanowski jt., 2009	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsüklit: 95°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s
<i>tetA</i>	tetA-F2 tetA-R2	TCAATTCCTGACGGGCTG GAAGCGAGCGGGTTGAGAG	96	0,4 0,4	Börjesson jt., 2009	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsüklit: 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s
<i>sulI</i>	sulI-F sulI-R	CTGAACGATATCCAAGGATTYCC* AAAAATCCCATCCCCGGRTC*	239	0,4 0,4	Heuer jt., 2008	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsüklit: 95°C 15 s, 54°C 30 s, 72°C 30 s
<i>qnrS</i>	QnrS-F QnrS-R	GTGAGTAATCGTATGTACTTTTG AAACACCTCGACTTAAGTCT	169	0,2 0,2	Guillard jt., 2011	50°C 2 min, 95°C 10 min, 45 tsüklit: 95°C 15 s, 52°C 30 s, 72°C 30 s

* R tähistab A või G nukleotiidi, Y tähistab C või T nukleotiidi, M tähistab A või C nukleotiidi, S tähistab G või C nukleotiidi

3. Tulemused

3.1. Orgaaniliste väetiste omadused

3.1.1. Veiseläga ja käärimisjäagi keemilised omadused

Väetistena kasutatud veiseläga ja veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäagi kirjeldati nende keemiliste omaduste alusel (Tabel 2). Orgaanilisi väetisi iseloomustasid neutraalne või nõrgalt aluseline pH, kõrge niiskusesisaldus (NS) (91,8% veiselägal ja 91,9% käärimisjäagil) ja sarnane orgaanilise kuivaine (oKA) sisaldus (vastavalt 68,6% ja 63,3%). Kasutatud käärimisjäagis tuvastati kõrgemad toitainete ja makroelementide kontsentratsioonid kui veiselägas.

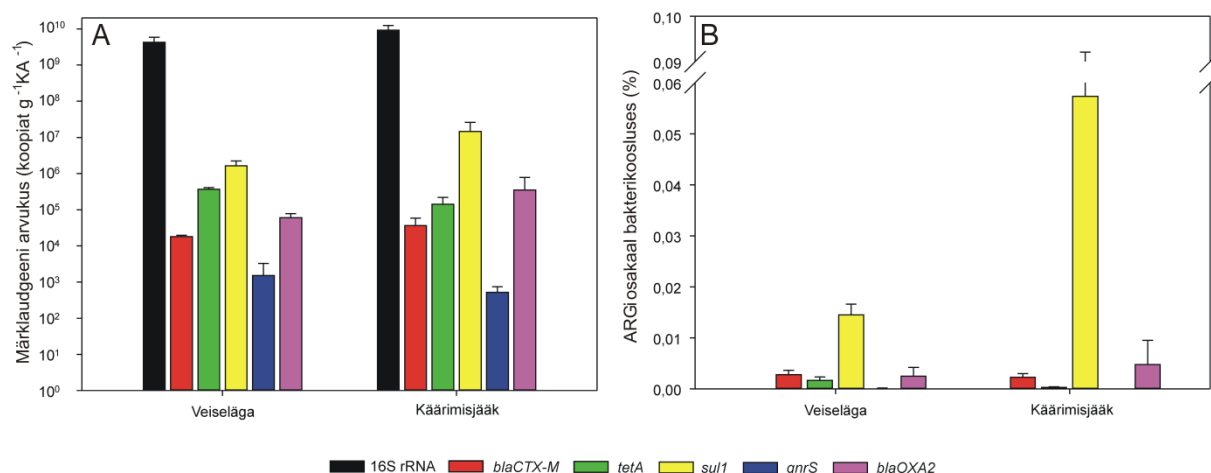
Tabel 2. Kolme väetamiskorra veiseläga ja veiseläga käärimisjäagi keemiliste omaduste keskmised väärtused koos standardhälbega (sulgudes). oKA – orgaaniline kuivaine, NS – niiskusesisaldus, $\text{NH}_4\text{-N}$ – ammoniumlämmastik, $\text{NO}_3\text{-N}$ – nitraatlämmastik, N_K – Kjeldahli lämmastik, P_LL – laktaatlahustuv fosfor, K_LL – laktaatlahustuv kaalium, Ca_LL – laktaatlahustuv kaltsium, Mg_LL – laktaatlahustuv magneesium.

Keemiline näitaja	Ühik	Veiseläga (n=3)	Käärimisjääk (n=3)
pH		7,07 ($\pm 0,27$)	8,00 ($\pm 0,32$)
oKA	%	68,6 ($\pm 3,4$)	63,3 ($\pm 4,2$)
NS	%	91,8 ($\pm 0,2$)	91,9 ($\pm 1,1$)
$\text{NH}_4\text{-N}$	mg kg ⁻¹	2356 (± 176)	2510 (± 69)
$\text{NO}_3\text{-N}$	mg kg ⁻¹	0,49 ($\pm 0,69$)	1,23 ($\pm 0,63$)
N_K	%	0,393 ($\pm 0,008$)	0,432 ($\pm 0,028$)
P_LL	%	0,068 ($\pm 0,013$)	0,079 ($\pm 0,012$)
K_LL	%	0,260 ($\pm 0,027$)	0,348 ($\pm 0,024$)
Ca_LL	%	0,091 ($\pm 0,014$)	0,126 ($\pm 0,001$)
Mg_LL	%	0,072 ($\pm 0,014$)	0,085 ($\pm 0,020$)

3.1.2. 16S rRNA ja ARGide sisaldus veiselägas ja käärimisjäagis

Märklaudgeenide sisaldus veiselägas ja veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäagis oli sarnase jaotusega (Joonis 5). Bakterite üldarvukust näitav 16S rRNA kontsentratsioon oli käärimisjäagis ligikaudu poole kõrgem kui veiselägas (vastavalt $9,21 \cdot 10^9$ käärimisjäagis ja $4,25 \cdot 10^9$ koopiat g⁻¹ KA⁻¹ veiselägas), individuaalsete ARGide keskmine arvukus mõlemas väetises jäi vahemikku 10^3 kuni 10^7 koopiat g⁻¹ KA⁻¹. Nii veiselägas kui käärimisjäagis oli arvukaim ARG sulfoonamiidresistentsust kodeeriv *sulI* (vastavalt $1,63 \cdot 10^6$ lāgas ja $1,46 \cdot 10^7$ koopiat g⁻¹ KA⁻¹ käärimisjäagis), moodustades bakterite üldarvukusest veiselägas 0,014% ja käärimisjäagis 0,057%. Veiselägas tuvastati käärimisjäagist kõrgemad *tetA* ja *qnrS* sisaldused

(vastavalt $3,69 \cdot 10^5$ ja $1,52 \cdot 10^3$ koopiat $\text{g}^{-1} \text{KA}^{-1}$ veiselägas ning $1,41 \cdot 10^5$ ja $5,17 \cdot 10^2$ koopiat $\text{g}^{-1} \text{KA}^{-1}$ käärimisjägis), kuid käärimisjägis olid kõrgemad β -laktaamide resistentsust kodeerivate *blaCTX-M* ja *blaOXA2* arvukused (vastavalt $3,63 \cdot 10^4$ ja $3,49 \cdot 10^5$ koopiat $\text{g}^{-1} \text{KA}^{-1}$ käärimisjägis ning $1,90 \cdot 10^4$ ja $6,03 \cdot 10^4$ koopiat $\text{g}^{-1} \text{KA}^{-1}$ veiselägas). Testitud ARGid moodustasid veiseläga bakterikooslusest 0,00007% kuni 0,014% ja käärimisjägi bakterikooslusest 0,00001% kuni 0,057%.

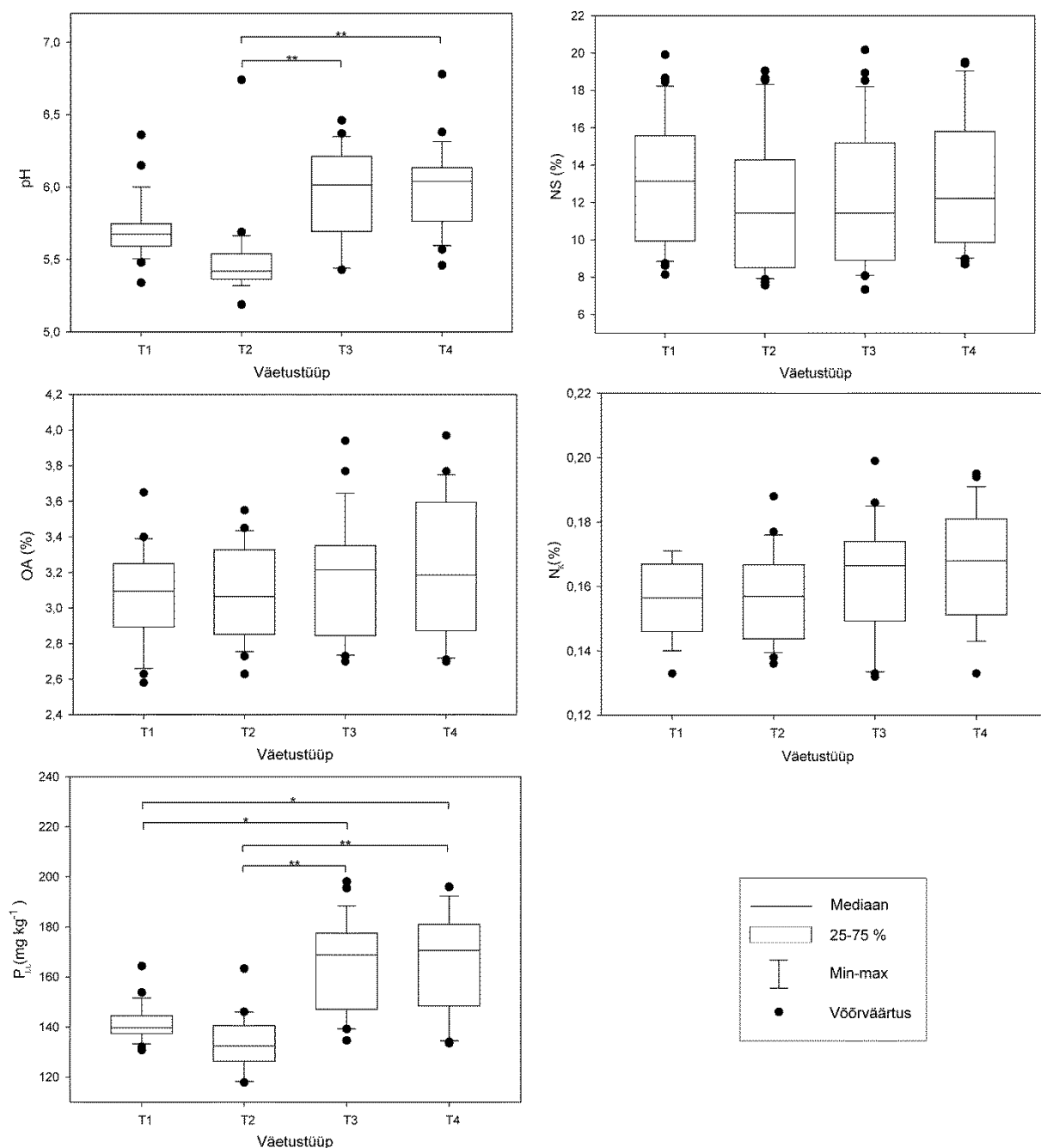


Joonis 5. 16S rRNA ja ARGide keskmine arvukus (A) ja ARGide osakaal (B) veiselägas ning veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjägis koos standardhälbega (n=3).

3.2. Põllumajandusliku rohumaa mullaproovide omadused

3.2.1. Mullaproovide keemilised omadused

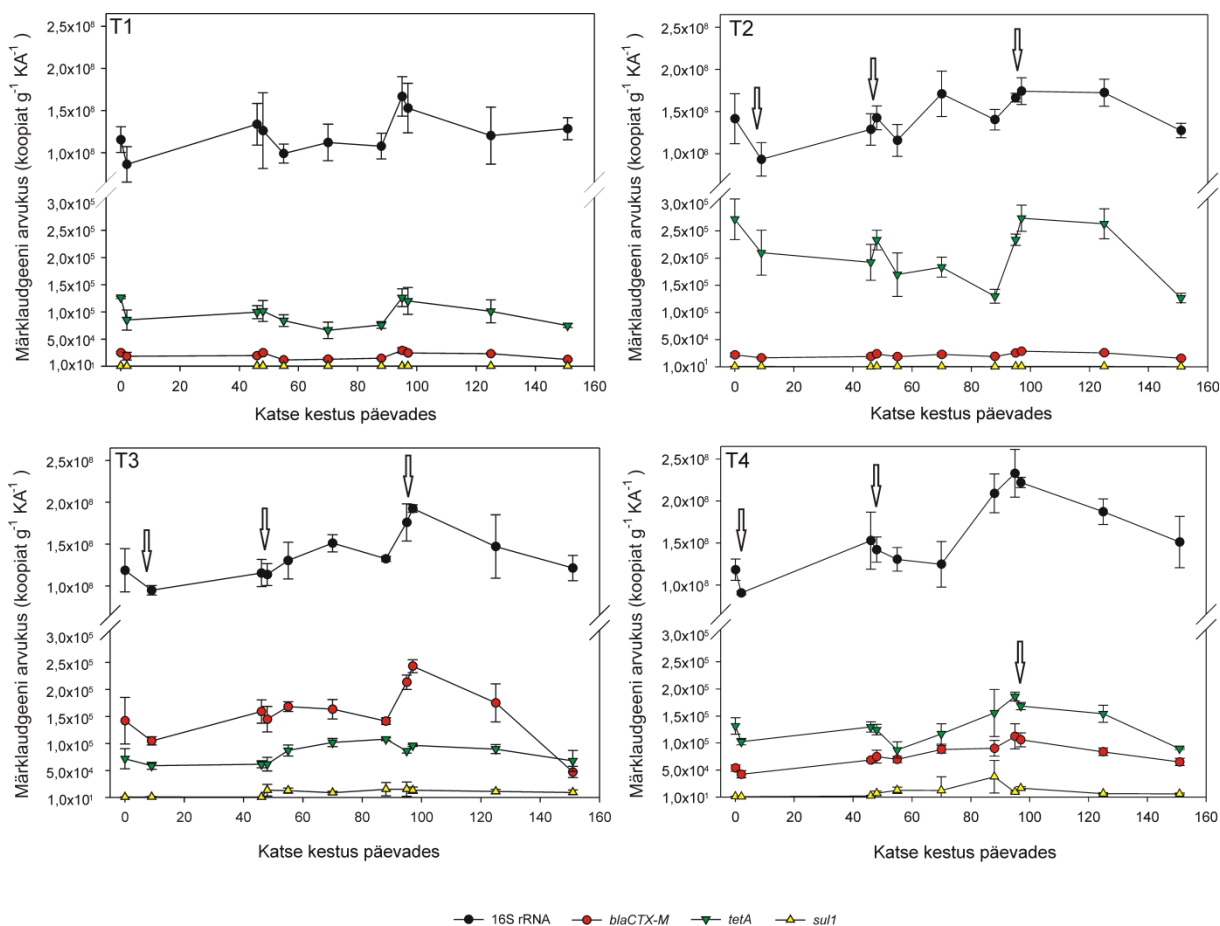
Mullaproovidest määrati pH, orgaanilise aine (OA), niiskuse (NS), Kjeldahli lämmastiku (N_K) ja laktaatlahustuva fosfori (P_{LL}) sisaldus (Lisa 3) ning analüüsi tulemusi korduvmõõtmiste dispersioonanalüüsiga (rANOVA) sõltuvalt rakendatud väetustüübist (Joonis 6). Mullaproovide pH oli mõõdukalt happeline, varieerudes vahemikus 5,19 kuni 6,78, kusjuures veiseläga ja käärimisjägiga väetatud katsealadel T3 ja T4 oli pH statistiliselt oluliselt kõrgem ($p < 0,01$) kui mineraalväetisega väetatud katsealal T2. Sarnane mõju avaldus P_{LL} sisalduses, mis varieerus vahemikus 117 mg kg^{-1} kuni 198 mg kg^{-1} ja oli orgaaniliste väetistega väetatud mullas oluliselt kõrgem ($p < 0,05$) kui T1 ja T2 aladel. Mullaproovide keskmine niiskusesisaldus oli 12,8%, keskmine OA sisaldus 3,14% ja keskmine N_K sisaldus 0,161%. NS, OA ja N_K korral väetustüüpide vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei esinenud.



Joonis 6. Mullaproovide keemilised omadused sõltuvalt väetustüübist (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga). NS – niiskusesisaldus, OA – orgaanilise aine sisaldus, N_K – Kjeldahli lämmastik, P_{LL} – laktaatlahustuv fosfor. Tärnidega on tähistatud teineteisest statistiliselt oluliselt erinevad tulemused (rANOVA, * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

3.2.2. 16S rRNA ja ARGide arvukuse ning ARGide osakaalu ajaline dünaamika rohumaa mullas

Erinevalt väetatud katselappidel T1–T4 tuvastati 16S rRNA ja ARGide *blaCTX-M*, *tetA*, *sulI* ja *blaOXA2* sisaldus mullas (Joonised 7 ja 8). B-laktaamide resistentsusgeeni *blaOXA2* kogus oli allpool qPCR meetodi kvantifitseerimisläve, fluorokinoloonide resistentsusgeeni *qnrS* mullaproovidest ei leitud. Tuvastatud geenide arvukuse ja osakaalu ajalise dünaamika korreleerumist erinevatel katselappidel testiti Spearmani korrelatsioonanalüüsil (Tabel 3).



Joonis 7. 16S rRNA ja ARGide arvukuse dünaamika mullas koos standardhõlbega (n=3) sõltuvalt väetustüübist (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga). Nooltega on tähistatud vastavate väetiste lisamine. Vertikaaltelje skaala enne ja pärast lõiget on esitatud erineva sammuga.

Katseperioodi vältel oli bakterite üldarvukust näitav 16S rRNA suurusjärgus 10⁷ kuni 10⁸ koopiat g⁻¹ KA⁻¹, kusjuures madalaimad kontsentratsioonid esinesid väetamata kontrollalal T1 (8,63*10⁷ koopiat g⁻¹ KA⁻¹) ja kõrgeimad kontsentratsioonid veiseläga väetatud alal T4 (2,33*10⁸ koopiat g⁻¹ KA⁻¹). 16S rRNA arvukuse ajaline käik korreleerus väetuspaarides T1 ja

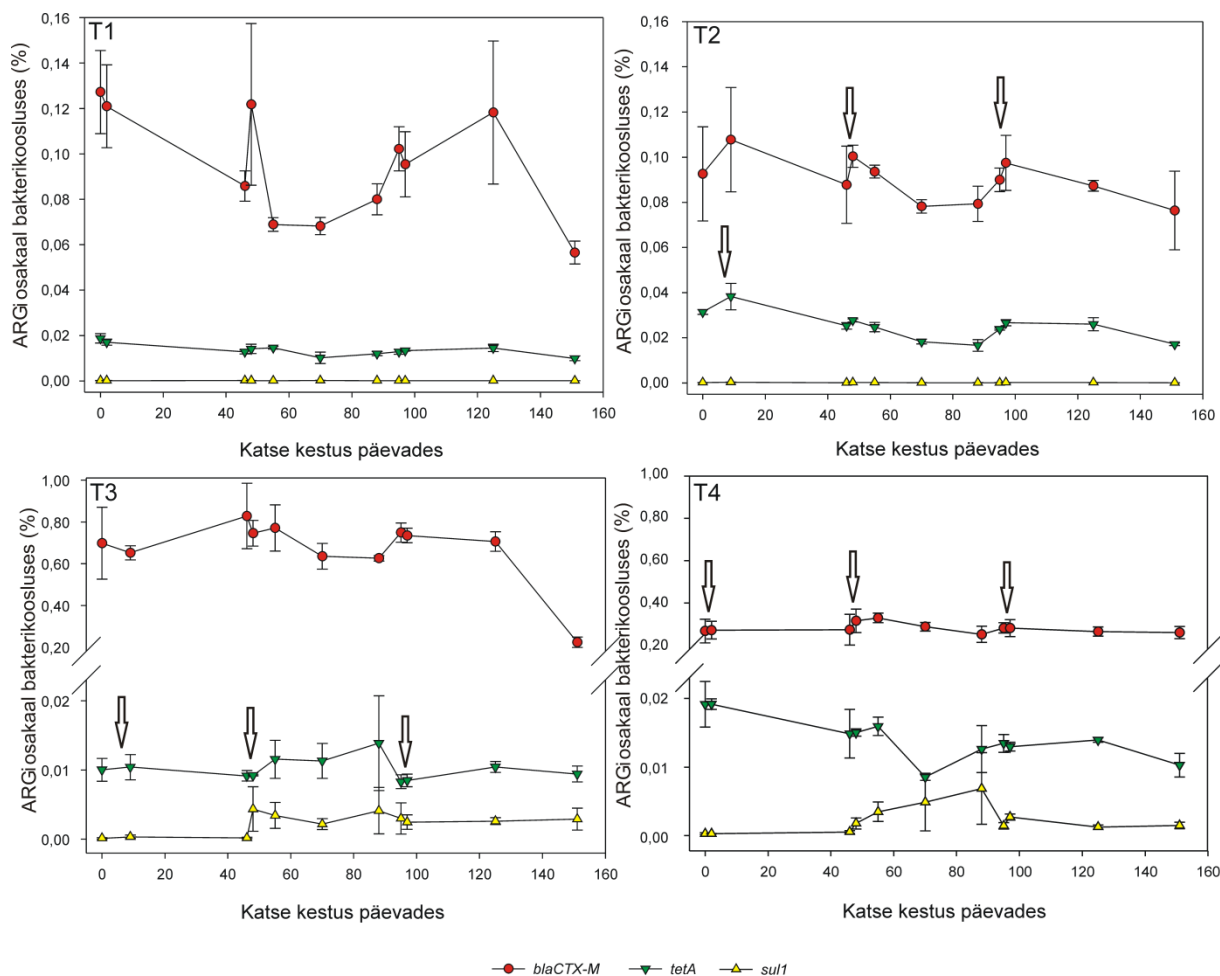
T4, T2 ja T3 ning T3 ja T4 (Tabel 3), näidates bakterite üldarvukuse dünaamika suhtelist sarnasust erinevatel töötlustel.

Tabel 3. Statistiliselt olulised ($p < 0,05$) seosed geenide absoluutarvukuse ja osakaalu dünaamikas erinevatel väetustüüpidel (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga) vastavalt Spearmani korrelatsioonikordajale R.

Märklaudgeen	Väetustüübid	Spearmani korrelatsioonikordaja R	
		Absoluutarvukus	Osakaal
16S rRNA	T1 ja T4	0,70*	Pole määratav
	T2 ja T3	0,72*	Pole määratav
	T3 ja T4	0,65*	Pole määratav
<i>blaCTX-M</i>	T1 ja T2	0,68*	0,67*
	T2 ja T3	0,81**	
	T2 ja T4	0,70*	
	T3 ja T4	0,70*	0,64*
<i>tetA</i>	T1 ja T2	0,87***	0,83**
	T1 ja T4	0,61*	0,90***
	T2 ja T4		0,80**
<i>sulI</i>	T3 ja T4	0,74**	0,63*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

Tuvastatud ARGide arvukus varieerus suurusjärgus 10^2 kuni 10^5 koopiat $g^{-1} KA^{-1}$, moodustades kuni 0,829% bakteriaalse 16S rRNA arvukusest mullas (*blaCTX-M* T3 katsealal). ARGide algkontsentratsioonid eksperimendi esimesel päeval erinesid erinevatel katsealadel (Joonis 7), viidates varasema väetamise võimalikule pikaajalisele mõjule. T1, T2 ja T4 aladel oli arvukaim ARG tetratsükliinresistentsust kodeeriv *tetA* ($5,86 \cdot 10^4$ kuni $2,73 \cdot 10^5$ koopiat $g^{-1} KA^{-1}$), mille osakaal bakterikoosluses oli nimetatud aladel sarnase ajalise dünaamikaga (Tabel 3). Käärimisjäägiga väetatud alal T3 avaldus kasutatud väetise mõju mulla β -laktaamresistentsusele: *blaCTX-M* oli antud väetustüübi arvukaim ARG (T3 keskmine arvukus $1,55 \cdot 10^5$ koopiat $g^{-1} KA^{-1}$), kuid selle ajaline käik korreleerus erinevate väetustüüpide vahel. Kõigis väetustüüpides oli kvantifitseeritud geenidest madalaima sisaldusega sünteetiliste antibiootikumide sulfoonamiidide resistentsusgeen *sulI*, mille arvukus varieerus piirides $2,68 \cdot 10^2$ (väetamata kontrollalal) kuni $3,75 \cdot 10^4$ koopiat $g^{-1} KA^{-1}$ (veiseläga väetatud katsealal), moodustades kuni 0,007% mulla bakterikooslusest. Nii *sulI* arvukuse kui osakaalu ajaline dünaamika korreleerusid T3 ja T4 katsealal, näidates orgaaniliste väetiste sarnast mõju mulla sulfoonamiidresistentsusele.



Joonis 8. ARGide osakaalude dünaamika mulla mikroobikoosluses koos standardhällbega (n=3) sõltuvalt väetustüübist (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga). Nooltega on tähistatud vastavate väetiste lisamine. Vertikaaltelje skaala enne ja pärast löiget on esitatud erineva sammuga.

Väetiste lisamine katse 2. (9.), 48. ja 97. päeval geenide arvukuse ja osakaalu lühiajalist dünaamikat märkimisväärselt ei mõjutanud: täheldati nii geenide sisalduse tõusu kui langust väetamisele järgneval päeval ning kirjeldatud muutused toimusid nii väetatud kui väetamata katselappidel. Väetamise mõju erinevate geenide dünaamikale ühe väetustüübi piires testiti Spearmani korrelatsioonanalüüsiga (Tabel 4). Tuvastati 16S rRNA arvukuse korreleerumine *blaCTX-M* ja *tetA* geenidega T2, T3 ja T4 katsealadel, mis näitab loodusliku taustkontsentratsiooniga ARGide sõltumist bakterite üldarvukusest. Lisaks tuvastati nimetatud loodusliku päritoluga ARGide omavaheline korreleerumine T1, T2 ja T4 aladel. Sünteetiliste antibiootikumide sulfoonamiidide resistentsust kodeeriva *sul1* ajaline käik oli T2 ja T4 aladel seoses *blaCTX-M* ja *tetA* dünaamikaga, seejuures veiseläga väetatud alal T4 *sul1* osakaalu kasvades *tetA* osakaal bakterikoosluses kahanes.

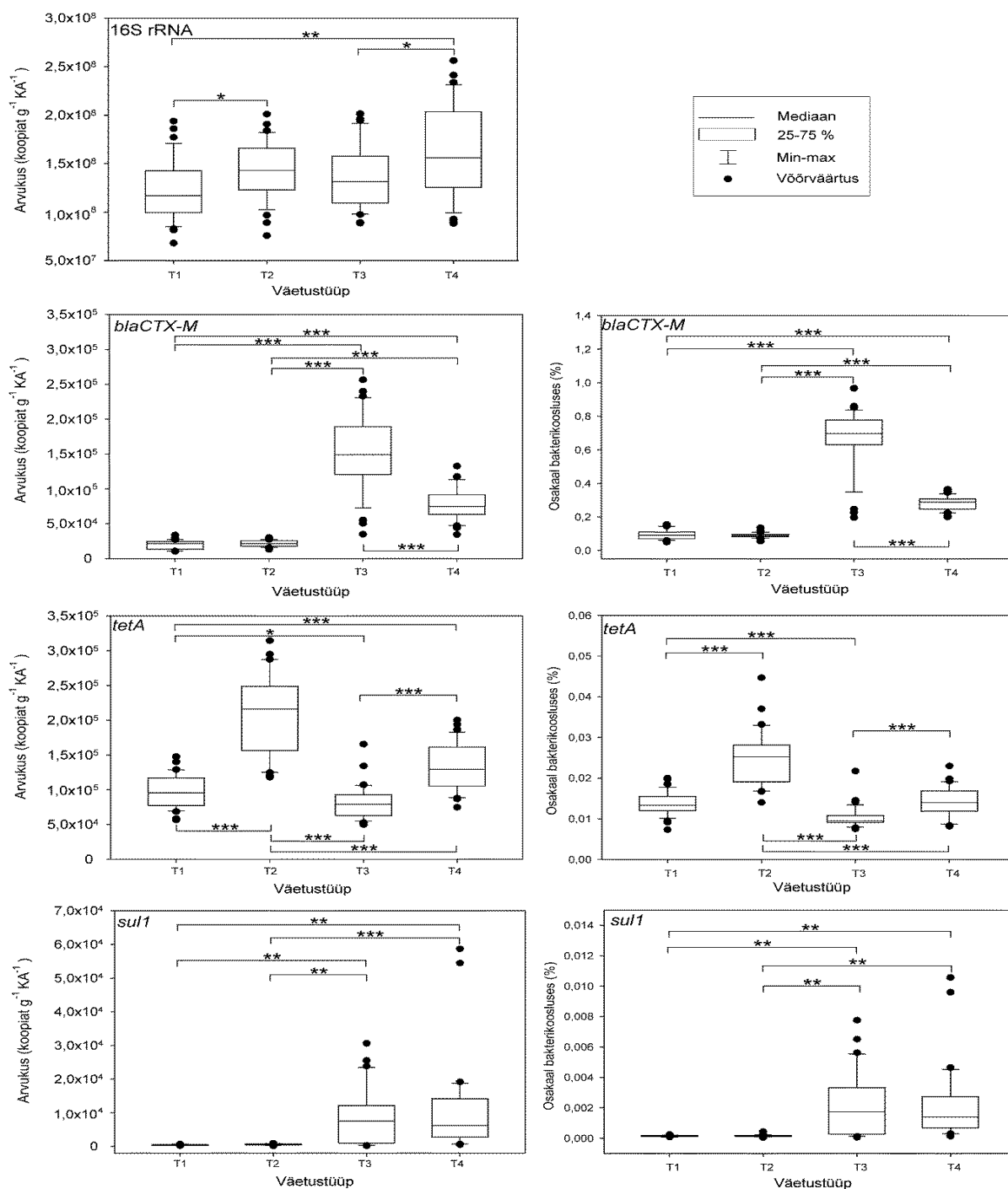
Tabel 4. Statistiliselt olulised ($p < 0,05$) seosed eri geenide absoluutarvukuse ja osakaalu dünaamikas ühe väetustüübi piires (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga) vastavalt Spearmani korrelatsioonikordajale R.

Väetustüüp	Geenipaar	Spearmani korrelatsioonikordaja R	
		Absoluutarvukus	Osakaal
T1	<i>blaCTX-M</i> ja <i>tetA</i>	0,92***	0,76**
T2	16S rRNA ja <i>blaCTX-M</i>	0,94***	
	16S rRNA ja <i>tetA</i>	0,63*	
	<i>blaCTX-M</i> ja <i>tetA</i>	0,78**	0,82**
	<i>blaCTX-M</i> ja <i>sulI</i>		0,87***
	<i>tetA</i> ja <i>sulI</i>	0,74**	0,83**
T3	16S rRNA ja <i>blaCTX-M</i>	0,73*	
	16S rRNA ja <i>tetA</i>	0,81**	
T4	16S rRNA ja <i>blaCTX-M</i>	0,86***	
	16S rRNA ja <i>tetA</i>	0,75**	
	<i>blaCTX-M</i> ja <i>tetA</i>	0,72*	
	<i>blaCTX-M</i> ja <i>sulI</i>	0,77**	
	<i>tetA</i> ja <i>sulI</i>		-0,65*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

3.2.3. Väetustüüpidevahelised erinevused märklaudgeenide arvukuses ja osakaalus

Korduvmõõtmiste dispersioonanalüüsiga (rANOVA) testiti märklaudgeenide absoluutarvukuse ja osakaalu erinevusi sõltuvalt rakendatud väetustüübist (Joonis 9). 16S rRNA arvukus oli madalaim väetamata kontrollalal T1 ning kõrgeim veiseläga väetatud alal T4 (erinevuse statistiline olulisus $p < 0,01$). *BlaCTX-M* sisaldus oli kõrgeim käärimisjäägiga väetatud alal T3, erinedes statistiliselt kõigist ülejäänud väetustüüpidest ($p < 0,001$) ja avaldades nii *blaCTX-M* absoluutarvukuse kui osakaalu puhul. Seevastu *tetA* arvukuse ja osakaalu kõrgväärtused esinesid mineraalväetisega töödeldud alal T2, mis erines oluliselt kõigist ülejäänud väetustüüpidest ($p < 0,001$). *SulI* korral olid teineteisele statistiliselt sarnased T1 ja T2, mida iseloomustasid oluliselt madalamad *sulI* absoluutarvukuse ja osakaalu väärtused kui orgaaniliste väetistega väetatud aladel T3 ja T4 ($p < 0,01$). T3 ja T4 vahel *sulI* puhul statistilist erinevust ei esinenud.



Joonis 9. 16S rRNA ja ARGide arvukuse ning bakterikoosluse ARGide osakaalu erinevine sõltuvalt väetustüübist (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga). Tähtsusega on tähistatud teineteisest statistiliselt oluliselt erinevad tulemused (rANOVA, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2.4. Märklaudgeenide arvukuse ja osakaalu seos mulla keemiliste omadustega

Uuritud geenide arvukuse ja osakaalu sõltumist mulla keemilistest parameetritest analüüsiti Spearmani korrelatsioonikordajate alusel (Tabel 5). Väetamata katsealal T1 ja

mineraalväetisega töödeldud alal T2 tuvastati üksikud seosed geeniparameetrite ja mulla keemiliste näitajate vahel, kuid orgaaniliste väetistega töödeldud aladel T3 ja T4 esines arvukamalt seoseid spetsiifiliste geenide ja mulla pH, niiskusesisalduse, OA, N_K ning P_{LL} väärtuste vahel, näitlikustades veiseläga ja käärimisjäägi suuremat mõju mulla keemilistele omadustele ja mikrobioomile. Orgaaniliste väetistega väetatud aladel T3 ja T4 oli bakterite üldarvukus positiivses seoses mulla OA ja N_K sisaldusega, kuid sõltus negatiivselt T1, T3 ja T4 alade mulla niiskusesisaldusest. Sarnane seos avaldus ka ARGide arvukuses T4 katsealal: niiskusesisalduse suurenedes vähenesid *blaCTX-M*, *tetA* ja *sulI* kontsentratsioonid mullas. Nii T3 kui T4 alal korreleerus sulfoonamiidresistentsust kodeeriva *sulI* arvukus mulla OA, N_K ja P_{LL} sisaldusega, lisaks sõltus *sulI* osakaal veiselägaga väetatud mulla pH, OA ja P_{LL} näitajatest. Tetratsükliinresistentsust kodeeriva *tetA* osakaalu puhul avaldusid negatiivsed seosed T4 OA, N_K ja P_{LL} sisaldusega.

Tabel 5. Statistiliselt olulised (p<0,05) seosed mulla keemiliste näitajate ja uuritud geenide absoluutarvukuse ning osakaalu vahel sõltuvalt väetustüübist (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga) vastavalt Spearmani korrelatsioonikordajale R. NS – niiskusesisaldus, OA – orgaaniline kuivaine, N_K – Kjeldahli lämmastik, P_{LL} – laktaatlahustuv fosfor.

Väetustüüp	Mulla keemiline näitaja	Spearmani korrelatsioonikordaja R					
		Absoluutarvukus 16S rRNA	<i>blaCTX-M</i>	<i>tetA</i>	<i>sulI</i>	Osakaal <i>tetA</i>	<i>sulI</i>
T1	NS	-0,81*					
T2	OA	0,83*	0,74*				
T3	pH	0,88**	0,71*	0,86**			
	OA	0,81*			0,83*		
	N _K	0,75*			0,85**		
	P _{LL}				0,71*		
	NS	-0,71*	-0,79*			0,71*	
T4	pH						0,76*
	OA	0,88**	0,88**		0,90**	-0,81*	0,76*
	N _K	0,76*	0,76*		0,81*	-0,79*	
	P _{LL}				0,79*	-0,81*	0,76*
	NS	-0,95***	-0,93***	-0,76*	-0,81*		

* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001

4. Arutelu ja järeldused

Mulda peetakse rikkaimaks ARGide reservuaariks keskkonnas (Cytryn, 2013), mida iseloomustavad nii looduslik antibiootikumresistentsuse taustkontsentratsioon kui ka peamiselt põllumajandusest pärinevad antropogeensed mõjutused. Käesolevas töös vaadeldi kolme erineva väetise (mineraalväetise, veiseläga ja veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäägi) mõju antibiootikumresistentsusgeenide sisaldusele rohumaa mullas.

Loomakasvatuse jääkproduktide nagu läga ja sõnniku kasutamine põllumajandusväetistena on üks peamisi viise ARE levimisel farmidest looduskeskkonda (Heuer jt., 2011). Antud eksperimendis kasutatud veiseläga ja veiseläga käärimisjäägi bakterite üldarvukust näitav 16S rRNA oli suurusjärgus 10^9 koopiat g^{-1} KA $^{-1}$, mis on kooskõlas hiljuti avaldatud piimakarja sõnniku anaeroobse lagundamise uuringuga (Resende jt., 2014a). Arvukalt leiti veiselägas sulfoonamiidresistentsust kodeerivat geeni *sulI*, mille absoluutarvukus oli madalam varem avaldatud andmetest (Munir ja Xagorarak, 2011), kuid moodustas bakterite üldarvukusest kõrgema fraktsiooni kui täheldatud sarnastes uuringutes veise- ja sealäga (Heuer jt., 2008; Munir ja Xagorarak, 2011). On tähelepanuväärne, et just sünteetiliste antibiootikumide sulfoonamiidide resistentsusgeeni *sulI*, millel puudub looduslik taustkontsentratsioon, leiti kõrges kontsentratsioonis nii veiselägas kui käärimisjäägis. Seevastu teist uuritud sünteetiliste antibiootikumide resistentsusgeeni *qnrS* leidus kasutatud orgaanilistes väetistes madalates kogustes, mis viitab fluorokinoloonide potentsiaalsele efektiivsusele antibiootikumteraapias. Kõigi uuritud ARGide esinemine veiselägas suurusjärgus 10^3 kuni 10^6 koopiat g^{-1} KA $^{-1}$ kinnitab varem avaldatud uuringute tulemusi, näidates, et veiseläga on oluline ARGide reservuaar (Storteboom jt., 2007; Munir ja Xagorarak, 2011; Wolters jt., 2015).

Loomasõnniku ja –läga anaeroobset lagundamist on peetud jätkusuutlikuks orgaaniliste jäätmete stabiliseerimise meetodiks, tootes lisaks energiale ka põllumajandusliku väärtusega käärimisjääki (Weiland, 2010). Antud uuringus kasutatud veiseläga mesofiilse lagundamise käärimisjäägis oli bakterite üldarvukus poole kõrgem kui teises orgaanilises väetises – veiselägas. Samuti tuvastati käärimisjäägist kõik uuritud ARGid, mille kontsentratsioonid jäid vahemikku 10^2 kuni 10^7 koopiat g^{-1} KA $^{-1}$. Võrreldes veiseläga erinesid individuaalsete ARGide sisaldused maksimaalselt ühe suurusjärgu võrra, kusjuures *blaOXA2*, *blaCTX-M* ja *sulI* sisaldused käärimisjäägis olid kõrgemad kui lägas, viidates käärimisjäägi kõrgemale riskipotentsiaalile ARE levikul farmist looduskeskkonda. Varasemates uuringutes on näidatud, et loomakasvatuse jääkproduktide termofiilne (55°C) anaeroobne lagundamine on efektiivne meetod antibiootikumresistentsete mikroobide ja ARGide vähendamiseks (Beneragama jt.,

2011; Varel jt., 2012; Beneragama jt., 2013), kuid mesofiilses temperatuurivahemikus (37–38°C) võivad nii mikroobid kui ARGid säilida ning kanduda edasi käärimisjääki (Chen jt., 2010; Beneragama jt., 2013; Resende jt., 2014a; Resende jt., 2014b). Antud uuringus näidati, et mesofiilse anaeroobse lagundamise käärimisjääk on ARGide reservuaar ja selle kasutamine väetisena võib hoogustada ARe levikut looduskeskkonnas ning mõjutada mulla ökoloogilist tasakaalu.

Välikatses tuvastati loodusliku taustkontsentratsiooniga ARGide *blaCTX-M* ning *tetA* ja peamiselt inimtegevuse mõju näitava ARGi *sulI* sisaldus nii väetatud kui väetamata põllumajandusliku rohumaa mullas ühe vegetatsiooniperioodi jooksul. Väetamine mõjutas mulla mikroobikooslust, tõstes spetsiifiliste ARGide kontsentratsioone. Saadud tulemused on kooskõlas varasemate uuringutega, kus on leitud, et veisesõnniku kasutamine väetisena võib tõsta ARGide taset mullas (Munir ja Xagorarak, 2011), kuid mõju avaldumine võib sõltuda nii mullatüübist (Munir ja Xagorarak, 2011) kui väetamise intensiivsusest (Kobashi jt., 2005; Ghosh ja LaPara, 2007). Täiendavad uuringud on vajalikud väetamise pikaajalise mõju selgitamiseks, mis võib seletada osade ARGide algkontsentratsioonide erinemist väetustüüpide vahel, arvestades, et rohumaa väetamine leidis aset ka proovivõtule eelneval aastal. Varasemates uuringutes on näidatud nii ARGide akumulereumist mullas (Knapp jt., 2010) kui ka kõrgeenenud ARe langemist looduslikule tasemele viie kuu jooksul pärast väetamist (Sengeløv jt., 2003). Käesolevas eksperimendis tuvastatud ARGide esinemine nii väetamata kui väetatud rohumaa mullas annab tunnistust mulla resistoomi mitmekesisusest, mida mõjutavad nii looduslikud kui antropogeensed tegurid (Cytryn, 2013).

Võrreldes teiste väetistega tõstis veiseläga kasutamine statistiliselt oluliselt *sulI* geeni sisaldust mullas, mida on osaliselt näidatud ka varasemates uuringutes (Heuer jt., 2008; Munir ja Xagorarak, 2011). Veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäägiga väetatud alal esines kõrgendatud *sulI* ja *blaCTX-M* sisaldus ning mineraalväetisega väetatud alal oli teistest väetustüüpidest kõrgem *tetA* sisaldus. Orgaaniliste väetistega väetatud alade puhul võib spetsiifiliste geenide sisalduse kasvu seletada väetistest pärinevate ARGide lisandumisega ning säilimisega mullas vähemalt ühe vegetatsiooniperioodi jooksul. Samuti võis resistentsust mõjutada mulla füüsikalise-keemiliste tingimuste muutumine väetamisel. Mineraalväetise kasutamine võis stimuleerida looduslikku mikroobikooslust ning seeläbi tõsta tetratsükliinresistentsuse hulka uuritud mullas. Bakterite üldarvukuse ja loodusliku taustkontsentratsiooniga ARGide vaheline seos avaldus ka geenide dünaamika korrelatsioonanalüüsil, kus näidati 16S rRNA arvukuse korreleerumist *blaCTX-M* ja *tetA*

geenidega väetatud katsealadel. Seega näidati antud uuringus, et väetamine mõjutab nii bakterite üldarvukust kui ka spetsiifiliste ARGide sisaldust väetatud mullas. Seejuures on oluline märkida, et väetamise efekt erinevatele ARGidele ei olnud ühene ning eri väetised mõjutasid spetsiifiliste ARGide sisaldust mullas erinevalt.

Spearmani korrelatsioonanalüüsil avaldusid seosed orgaaniliste väetistega väetatud katsealade keemiliste parameetrite ning uuritud märklaudgeenide sisalduse vahel. Leiti, et bakterite üldarvukus orgaaniliste väetistega väetatud aladel sõltus mulla orgaanilise aine ja lämmastiksisaldusest. Varem on avaldatud sarnane seos põllumajandusliku haritava mulla bakteriaalse biomassiga (Truu, 2008). Sulfoonamiidresistentsusgeeni *sulI* sisaldus nimetatud aladel sõltus lisaks orgaanilise aine ja lämmastiksisaldusele ka mulla fosforisisaldusest ning kõigil uuritud geenidel avaldus negatiivne seos mulla niiskusesisaldusega. Leitud korrelatsioonid näitavad füüsikalise-keemiliste tingimuste mõju nii bakterite üldarvukusele kui ARGide sisaldusele mullas. Seega on väetamisel otsene mõju mulla omadustele, mõjutades kaudselt ka mulla mikroobikooslust. Täiendavate konkreetsete seoste leidmine ARGide arvukuse ja keskkonnaparameetrite vahel on olulise tähtsusega mulla resistoomi kirjeldamisel ja mullast tuleneva ARE riskide hindamisel (Munir ja Xagorarak, 2011; Cytryn, 2013).

Magistritöö peamised järeldused on:

- 1) uuritud veiseläga ja veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjääk on ARGide reservuaarid;
- 2) väetamine muudab mulla keemilisi omadusi, mõjutades kaudselt ka mulla mikroobikooslust;
- 3) väetamine mõjutab oluliselt bakterite üldarvukust ja ARGide sisaldust mullas;
- 4) erinevate väetiste mõju spetsiifilistele ARGidele avaldub erinevalt: mineraalväetis tõstis oluliselt *tetA*, veiseläga *sulI* ja veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjääk *blaCTX-M* ning *sulI* sisaldust mullas.

Käesoleva töö tulemused kinnitavad nii looduslikku kui sünteetilist päritolu ARGide esinemist mullas, mis on potentsiaalne ARE leviku allikas. Orgaaniliste väetiste kasutamine lisab mulda olulisel määral resistentsid mikroobe ja ARGe, aga ka mobiilseid geneetilisi elemente, mis hoogustavad resistentsuse levikut (Heuer jt., 2011; Wolters jt., 2015). Bioinformaatiliste meetoditega on näidatud ARGide horisontaalne ülekandumine mullabakteritelt inimpatoogenidele (Forsberg jt., 2012) ning jätkuv geenitriiv mulla ja inimese mikrobioomi vahel on tõenäoline (Nesme jt., 2014). Lisaks võivad antibiootikumresistentsed

mikroobid jõuda inimesteni toidu ja joogivee kaudu, mõjutades soole loomulikku mikrofloorat (Marti jt., 2013). ARe levimine antroposfääris on teadusringkondades kõlapinda leidnud meditsiiniline ohuallikas, põhjustades antibiootikumteraapia efektiivsuse kahanemist ning ravile allumatute multiresistentsete bakteritüvede esinemist. ARe leviku pidurdamiseks on vajalik resistentsuse levikumehhanismide parem tundmaõppimine, keskendudes lisaks mikroobide liikumisele ka ARGide ja mobiilsete geneetiliste elementide ülekandele nii organismide kui keskkondade vahel (Wolters jt., 2015). Antibiootikumresistentsuse looduslike reservuaaride, sh. mulla resistoomi detailne kirjeldamine on otsustava tähtsusega antibiootikumide meditsiinilise efektiivsuse säilimiseks (Allen jt., 2010; Cytryn, 2013).

Kokkuvõte

Intensiivne antibiootikumide kasutamine hoogustab antibiootikumresistentsuse levikut, mida peetakse kaasaegse meditsiini üheks suuremaks väljakutseks. Oluline antibiootikumresistentsuse allikas on põllumajandus, kus väetistena kasutatavate sõnniku ja lágaga viiakse mulda resistentsid mikroobe ja antibiootikumresistentsusgeene. Käesoleva töö eesmärk oli hinnata veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäägi mõju bakteriaalse 16S rRNA ja viie ARGi (*blaCTX-M*, *blaOXA2*, *tetA*, *sulI* ja *qnrS*) sisaldusele põllumajandusliku rohumaa mullas, määrates kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooniga nimetatud geenide üldarvukuse ning ARGide osakaalu mulla bakterikoosluses. Võrdlusena kasutati mineraalväetist, veiseläga ja väetamata kontrollala.

Kasutatud veiseläga ja veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjääk olid keemiliselt sarnased ning neis tuvastati kõik uuritud ARGid. Bakterite üldarvukus oli käärimisjäägis kaks korda kõrgem kui veiselägas ning individuaalsete ARGide kontsentratsioonid jäid suurusjärku 10^3 kuni 10^7 koopiat $g^{-1} KA^{-1}$, näidates, et kasutatud orgaanilised väetised olid ARGide reservuaariks. Väetamine mõjutas nii mulla keemilisi näitajaid kui ARGide sisaldust rohumaa mullas. Bakterite üldarvukus oli madalaim väetamata kontrollalal ja kõrgeim veiseläga väetatud mullas, varieerudes suurusjärgus 10^7 kuni 10^8 koopiat $g^{-1} KA^{-1}$. ARGidest tuvastati mullast *tetA*, *blaCTX-M* ja *sulI*, mille kontsentratsioonid jäid suurusjärku 10^2 kuni 10^5 koopiat $g^{-1} KA^{-1}$, *blaOXA2* sisaldus mullas oli allpool meetodi kvantifitseerimisläve ja *qnrS* mullas ei leidunud. Spearmani korrelatsioonanalüüsiga tuvastati seosed orgaaniliste väetistega väetatud mulla keemiliste omaduste ja ARGide sisalduse vahel, mille edasine tõlgendamine on olulise tähtsusega mulla resistoomi paremaks mõistmiseks.

Käesolevas töös näidati kasutatud väetiste spetsiifiline mõju ARGide sisaldusele rohumaa mullas: mineraalväetisega töödeldud alal esines võrreldes teiste katsealadega kõrgeim *tetA* kontsentratsioon, veiseläga töödeldud alal kõrgeim *sulI* kontsentratsioon ja veiseläga anaeroobse lagundamise käärimisjäägiga töödeldud alal kõrgeim *blaCTX-M* ja *sulI* kontsentratsioonid. Seega tõstsid kasutatud väetised spetsiifiliste ARGide sisaldust mullas, olles potentsiaalsed riskiallikad antibiootikumresistentsuse edasilevimisel.

Magistritöös kirjeldati väetamise mõju mulla ARGide sisaldusele ühe vegetatsiooniperioodi jooksul. Vajalik on edasine uurimistöö põllumajanduslike praktikate pikaajalise mõju selgitamiseks ja anaeroobse käitlustehnoloogia arendamiseks, et vähendada käärimisjäägi

võimalikku mõju mulla resistoomile. Jätkuv teadustöö loob aluse antibiootikumresistentsuse meditsiiniliste ja ökoloogiliste riskide põhjendatud hindamiseks.

The Effect of Digestate on the Antibiotic Resistance Genes in Agricultural Grassland Soil

Kärt Kanger

Summary

The extensive use of antibiotics in human and veterinary medicines has driven the spread of antibiotic resistance among bacterial communities. The dissemination and evolution of antibiotic resistance exhibits ecotoxicological effects and poses risks to public health. Although antibiotic resistance is of natural origin, numerous anthropogenic sources contribute to the proliferation of resistance, including antibiotic use in clinical and agricultural settings. Land application of animal manure provides high nutrient and microbial load to the soil, however, it is also a major source of resistance introducing residues of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARG) to the environment.

The goal of the thesis was to assess the effect of cattle slurry digestate in comparison with mineral fertilizer and cattle slurry on the abundance of bacterial 16S rRNA and five antibiotic resistance genes (*blaCTX-M*, *blaOXA2*, *tetA*, *sul1*, and *qnrS*) in the soil of an agricultural grassland, and to determine the respective antibiotic resistance gene proportions in the total bacterial community of soil using quantitative polymerase chain reaction.

The results showed similarities between studied organic fertilizers: cattle slurry and cattle slurry digestate had similar chemical parameters and contained all studied ARGs. The concentration of 16S rRNA reflecting the abundance of bacterial community was twice as high in cattle slurry digestate compared to cattle slurry. Both organic fertilizers proved to be considerable sources of ARGs with recorded individual ARG concentrations at a level of 10^3 to 10^7 copies $\text{g}^{-1} \text{dw}^{-1}$.

The fertilization affected both the soil chemical parameters and the concentration of ARGs in the soil. The total bacterial abundance was lowest in untreated soil and highest in the soil treated with cattle slurry, ranging between 10^7 and 10^8 copies $\text{g}^{-1} \text{dw}^{-1}$. Detected ARGs in the soil included *tetA*, *blaCTX-M* and *sul1* with concentrations remaining between 10^2 to 10^5 copies $\text{g}^{-1} \text{dw}^{-1}$. Spearman rank-order correlation analysis revealed relationships between the chemical parameters of soil and the abundance of ARGs in soil treated with organic fertilizers, which require further interpretation by future studies.

The results indicate a distinct effect of fertilization on the specific ARGs in soil: mineral fertilizer amendment enhanced the abundance of *tetA*, cattle slurry treatment enhanced the abundance of *sulI* and cattle slurry digestate enhanced the abundances of *blaCTX-M* as well as *sulI*. Therefore, studied fertilizers can be considered as potential contributors to the spread and proliferation of antibiotic resistance genes in the soil microbial community.

The thesis studied the effects of fertilization on the ARGs in agricultural grassland soil during one vegetation period. Further studies are necessary to determine the long-term effect of agricultural practices on the spread of antibiotic resistance and to fully examine the ecotoxicological as well as public health risks of antibiotic resistance. Such complex studies would allow estimating the need for the development of improved anaerobic treatment technologies with lower impact on soil resistome for cattle manure management.

Tänuavaldused

Magistritööd rahastati Eesti Põllumajandusministeeriumi projekti number 372 ja Maateaduste ja ökoloogia doktorikooli interdistsiplinaarse uurimisprojekti „Veise läga ja selle digestaadi mõju rohumaa mikroobikooslusele“ raames.

Soovin tänada Mailiis Tamperet Eesti Maaülikoolist välikatse läbiviimise eest ning Hiie Nõlvakut ja Jaak Truud pühendunud juhendamise eest. Samuti tänan Tartu Ülikooli Ökoloogia ja maateaduste instituudi geograafia osakonna keskkonna mikrobioloogia töögrupi liikmeid mitmekülgse abi eest magistritöö valmimisel.

Kasutatud kirjandus

Abdul, P., Lloyd, D., 1985. The survival of antibiotic resistant and sensitive *Escherichia coli* strains during anaerobic digestion. *Applied Microbiology and Biotechnology* 22, 373–377.

Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* 8, 251–259.

Al Seadi, T., Drog, B., Fuchs, W., Rutz, D., Janssen, R., 2013. Biogas digestate quality and utilization. Ilmunud: A. Wellinger, J. Murphy, D. Baxter (toimetajad), The biogas handbook, Science, production and applications. Woodhead Publishing Series in Energy: Number 52. Woodhead Publishing, Oxford, Cambridge, Philadelphia, New Delhi, 267–301.

APHA, 1989. Standard methods for the examination of water and waste water. 17th edition. L.S. Clesceri, A.E. Greenberg, R.R. Trussell (toimetajad). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington, DC, USA.

Baltz, R.H., 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 557–563.

Beneragama, N., Iwasaki, M., Lateef, S.A., Yamashiro, T., Ihara, I., Umetsu, K., 2013. The survival of multidrug-resistant bacteria in thermophilic and mesophilic anaerobic co-digestion of dairy manure and waste milk. *Animal Science Journal* 84, 426–433.

Beneragama, N., Yusuke, M., Yamashiro, T., Iwasaki, M., Adekunle, L.S., Umetsu, K., 2011. The Survival of Cefazolin Resistant Bacteria in Thermophilic Co-digestion of Dairy Manure and Waste Milk. *Journal of Agricultural Science and Technology A1*, 1181–1186.

Bernet, N., Béline, F., 2009. Challenges and innovations on biological treatment of livestock effluents. *Bioresource Technology* 100, 5431–5436.

Börjesson, S., Dienues, O., Jarnheimer, P.-Å., Olsen, B., Matussek, A., Lindgren, P.-E., 2009. Quantification of genes encoding resistance to aminoglycosides, β -lactams and tetracyclines in wastewater environments by real-time PCR. *International Journal of Environmental Health Research* 19(3), 219–230.

- Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.-F., Yannarell, A.C., Maxwell, S., Aminov, R.I., 2009. Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *Journal of Environmental Quality* 38, 1086–1108.
- Chen, J., Michel Jr., F.C., Sreevatsan, S., Morrison, M., Yu, Z., 2010. Occurrence and Persistence of Erythromycin Resistance Genes (*erm*) and Tetracycline Resistance Genes (*tet*) in Waste Treatment Systems on Swine Farms. *Microbial Ecology* 60, 479–486.
- Coates, A.R.M., Halls, G., Hu, Y., 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology* 163, 184–194.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS ONE* 6(3), e17549.
- Cytryn, E., 2013. The soil resistome: The anthropogenic, the native, and the unknown. *Soil Biology and Biochemistry* 63, 18–23.
- D’Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W.L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N., Wright, G.D., 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461.
- Dethlefsen, L., Huse, S., Sogin, M.L., Relman, D.A., 2008. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biology* 6(11), e280.
- Diehl, D.L., LaPara, T.M., 2010. Effect of Temperature on the Fate of Genes Encoding Tetracycline Resistance and the Integrase of Class 1 Integrons within Anaerobic and Aerobic Digesters Treating Municipal Wastewater Solids. *Environmental Science and Technology* 44, 9128–9133.
- Di Iaconi, C., 2012. Biological treatment and ozone oxidation: Integration or coupling? *Bioresource Technology* 106, 63–68.
- Divya, D., Gopinath, L.R., Merlin Christy, P., 2015. A review on current aspects and diverse prospects for enhancing biogas production in sustainable means. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42, 690–699.

ECDC, 2014. Summary of the latest data on antibiotic consumption in the European Union. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, Sweden.

EMA, 2014. Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. Fourth ESVAC report, EMA/333921/2014. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, London, United Kingdom.

Euroopa komisjon, 2003. Euroopa Parlamendi ja Nõukogu 22. septembri 2003. a. määrus (EÜ) nr. 1831/2003 loomasöötades kasutatavate söödalisandite kohta. ELT L 268, 18.10.2003, 29–43.

FAO, 2006. World Reference Base for Soil Resources, Second Edition. World Soil Resources Report 103. Food and Agriculture Organization, Rome, Italy.

Forsberg, K.J., Reyes, A., Wang, B., Selleck, E.M., Sommer, M.O.A., Dantas, G., 2012. The Shared Antibiotic Resistome of Soil Bacteria and Human Pathogens. *Science* 337, 1107–1111.

Ghosh, S., LaPara, T.M., 2007. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The ISME Journal* 1, 191–203.

Ghosh, S., Ramsden, S.J., LaPara, T.M., 2009. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84, 791–796.

Guillard, T., Moret, H., Brasme, L., Carlier, A., Vernet-Garnier, V., Cambau, E., de Champs, C., 2011. Rapid detection of *qnr* and *qepA* plasmid-mediated quinolone resistance genes using real-time PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 70(2), 253–259.

Gwynn, M.N., Portnoy, A., Rittenhouse, S.F., Payne, D.J., 2010. Challenges of antibacterial discovery revisited. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1213, 5–19.

Götz, A., Smalla, K., 1997. Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Applied and Environmental Microbiology* 63(5), 1980–1986.

Hao, H., Cheng, G., Iqbal, Z., Ai, X., Hussain, H.I., Huang, L., Dai, M., Wang, Y., Liu, Z., Yuan, Z., 2014. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in Microbiology* 5(288), 1–11.

Heuer, H., Focks, A., Lamshöft, M., Smalla, K., Matthies, M., Spiteller, M., 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1892–1900.

Heuer, H., Schmitt, H., Smalla, K., 2011. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Current Opinion in Microbiology* 14, 236–243.

Insam, H., Franke-Whittle, I., Goberna, M., 2010. Microbes in Aerobic and Anaerobic Waste Treatment. *Ilmunud: H. Insam, I. Franke-Whittle, M. Goberna (toimetajad), Microbes at Work, From Waste to Resources. Springer-Verlag, Berlin, 1–34.*

Kemper, N., 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 8, 1–13.

Keskkonnaamet, 2008. Keskkonnakompleksluba nr. L.KKL.TM-148833.

Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W., 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science and Technology* 44, 580–587.

Kobashi, Y., Hasebe, A., Nishio, M., 2005. Antibiotic-resistant Bacteria from Feces of Livestock, Farmyard Manure, and Farmland in Japan – case report –. *Microbes and Environments* 20(1), 53–60.

Kumar, K., Gupta, S.C., Chander, Y., Singh, A.K., 2005. Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. *Advances in Agronomy* 87, 1–54.

Kumar, R.R., Lee, J.T., Cho, J.Y., 2012. Fate, Occurrence, and Toxicity of Veterinary Antibiotics in Environment. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 55, 701–709.

Kümmerer, K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere* 75, 417–434.

- Kümmerer, K., Henninger, A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. *Clinical Microbiology and Infection* 9, 1203–1214.
- Li, J., Liu, S., Koh, J.-J., Zou, H., Lakshminarayanan, R., Bai, Y., Pervushin, K., Zhou, L., Verma, C., Beuerman, R.W., 2015. A novel fragment based strategy for membrane active antimicrobials against MRSA. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848, 1023–1031.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., Knight, R., 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* 35(18), e120.
- Ma, Y., Wilson, C.A., Novak, J.T., Riffat, R., Aynur, S., Murthy, S., Pruden, A., 2011. Effect of Various Sludge Digestion Conditions on Sulfonamide, Macrolide, and Tetracycline Resistance Genes and Class I Integrons. *Environmental Science and Technology* 45, 7855–7861.
- Marti, R., Scott, A., Tien, Y.-C., Murray, R., Sabourin, L., Zhang, Y., Topp, E., 2013. Impact of Manure Fertilization on the Abundance of Antibiotic-Resistant Bacteria and Frequency of Detection of Antibiotic Resistance Genes in Soil and on Vegetables at Harvest. *Applied and Environmental Microbiology* 79(18), 5701–5709.
- Martinez, J.L., 2008. Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments. *Science* 312, 365–367.
- Martinez, J.L., Coque, T.M., Baquero, F., 2015. What is resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology* 13, 116–123.
- Mitsuhashi, S., 1969. R-factors. *Journal of Infectious Diseases* 119, 89–91.
- Munir, M., Xagorarakis, I., 2011. Levels of Antibiotic Resistance Genes in Manure, Biosolids, and Fertilized Soil. *Journal of Environmental Quality* 40, 248–255.
- Nelja Energia, 2014. Oisu biogaasijaam. <http://www.4energia.ee/projektid/oisu-biogaasijaam/> (viimati külastatud 26.03.2014).
- Nesme, J., Cécillon, S., Delmont, T.O., Monier, J.-M., Vogel, T.M., Simonet, P., 2014. Large-Scale Metagenomic-Based Study of Antibiotic Resistance in the Environment. *Current Biology* 24, 1096–1100.

- Poeschl, M., Ward, S., Owende, P., 2010. Prospects for expanded utilization of biogas in Germany. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14, 1782–1797.
- Pourcher, A.-M., Jadas-Hécart, A., Cotinet, P., Dabert, P., Ziebal, C., Le Roux, S., Moraru, R., Heddadj, D., Kempf, I., 2014. Effect of land application of manure from enrofloxacin-treated chickens on ciprofloxacin resistance of Enterobacteriaceae in soil. *Science of the Total Environment* 482–483, 269–275.
- Resende, J.A., Diniz, C.G., Silva, V.L., Otenio, M.H., Bonnafous, A., Arcuri, P.B., Godon, J.-J., 2014a. Dynamics of antibiotic resistance genes and presence of putative pathogens during ambient temperature anaerobic digestion. *Journal of Applied Microbiology* 117, 1689–1699.
- Resende, J.A., Silva, V.L., de Oliveira, T.L.R., de Oliveira Fortunato, S., da Costa Carneiro, J., Otenio, M.H., Diniz, C.G., 2014b. Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresource Technology* 153, 284–291.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M.J.B., Moorman, A.F.M., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* 37(6), e45.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759.
- Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61(2), 262–280.
- Sengeløv, G., Agersø, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S.B., Andersen, J.S., Jensen L.B., 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International* 28, 587–595.
- Spellberg, B., Bartlett, J., Wunderink, R., Gilbert, D.N., 2015. Novel Approaches Are Needed to Develop Tomorrow's Antibacterial Therapies. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191(2), 135–140.

Storteboom, H.N., Kim, S.-C., Doesken, K.C., Carlson, K.H., Davis, J.G., Pruden, A., 2007. Response of Antibiotics and Resistance Genes to High-Intensity and Low-Intensity Manure Management. *Journal of Environmental Quality* 36, 1695–1703.

Szczepanowski, R., Linke, B., Krahm, I., Gartemann, K.H., Gützkow, T., Eichler, W., Pühler, A., Schlüter, A., 2009. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics. *Microbiology* 155, 2306–2319.

Thiele-Bruhn, S., 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 166, 145–167.

Truu, M., 2008. Impact of land use on microbial communities in Estonian soil. Doktoritöö. Tartu Ülikooli Molekulaar ja rakubioloogia instituut, Tartu, Eesti.

UCS, 2001. 70 Percent of All Antibiotics Given to Healthy Livestock. Press Release, January 8. Union of Concerned Scientists, Cambridge, Massachusetts, USA.

Van Boeckel, T.P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Laxminarayan, R., 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infectious Diseases* 14(8), 742–750.

Varel, V.H., Wells, J.E., Shelver, W.L., Rice, C.P., Armstrong, D.L., Parker, D.B., 2012. Effect of anaerobic digestion temperature on odour, coliforms and chlortetracycline in swine manure or monensin in cattle manure. *Journal of Applied Microbiology* 112, 705–715.

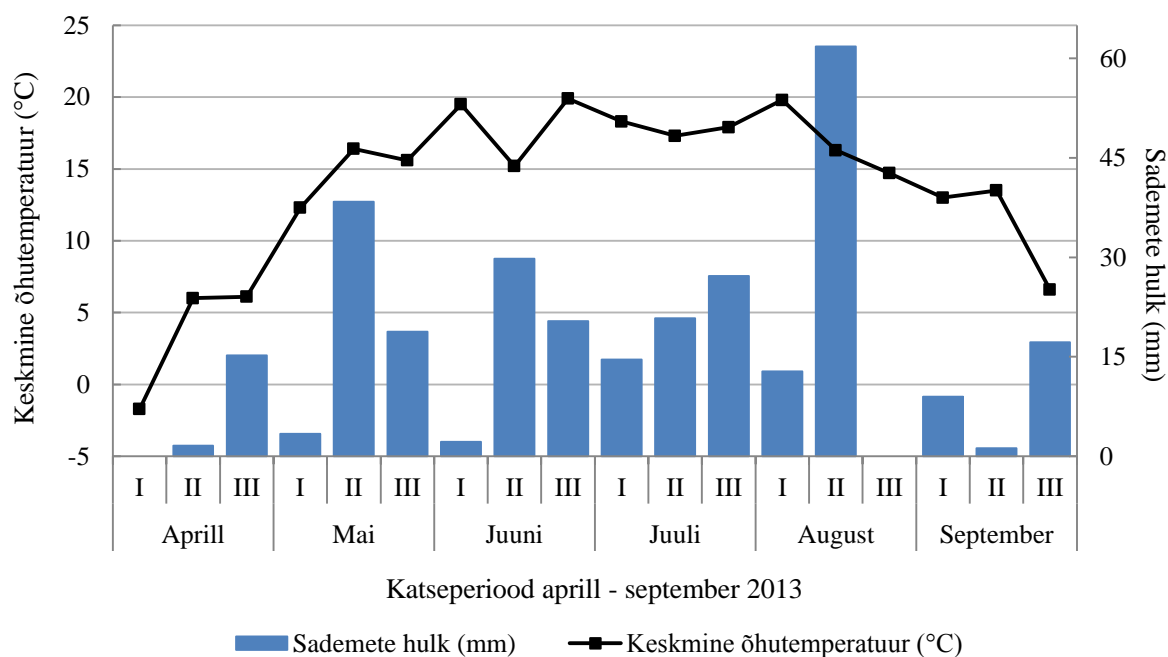
Weiland, P., 2010. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 849–860.

WHO, 2014. Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wise, R., 2002. Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49, 585–586.

Wolters, B., Kyselková, M., Krögerrecklenfort, E., Kreuzig, R., Smalla, K., 2015. Transferable antibiotic resistance plasmids from biogas plant digestates often belong to the IncP-1ε subgroup. *Frontiers in Microbiology* 5(765), 1–11.

Lisa 1. Katseala meteoroloogilised andmed katseperioodil



Joonis L1. Katseala keskmine õhutemperatuur ja sademete hulk aprillist septembrini 2013.

Lisa 2. Antibiootikumide kasutus Vorbuse lüpsilaudas

Tabel L1. Antibiootikumide kasutus Vorbuse lüpsilaudas perioodil detsember 2012 kuni aprill 2013.

Antibiootikumi tüüp	Ravimi nimetus	Toimeaine	Kogus
β-laktaamid	Bimoxyl LA	amoksitsilliin	33 382 ml
	Dufamox LA	amoksitsilliin	12 173 ml
	Vetrimoxin LA	amoksitsilliin	6800 ml
	Ceftiosan	tseftiofuur	2310 ml
	Eficur	tseftiofuur	1660 ml
	Excenel	tseftiofuur	775 ml
	Naxcel	tseftiofuur	40 ml
	Noroclox DC	kloksatsilliin	3063,5 gr
	Norocillin	prokaiinbensüülpenitsilliin	700 ml
Fluorokinoloonid	Ganadexil	enroflokstsaiin	13 986 ml
	Enrobioflox 5%	enroflokstsaiin	539 ml
Amfenikoolid	Tirsan	tiamfenikool	1100 ml
Tetratsükliinid	Engemycin LA	oksütetratsükliin	40 ml
Erinevate antibiootikumide segud	Pen/Strep	prokaiinbensüülpenitsilliin ja dihidrostreptomütsiin	4020 ml
	Micospectone	linkomütsiin ja spektinomütsiin	1000 ml

Lisa 3. Mullaproovide keemilised omadused

Tabel L2. Põllumajandusliku rohumaa mullaproovide keemiliste omaduste keskmised väärtused (n=3) koos standardhälbega (sulgudes) sõltuvalt väetustüübist (T1 – väetamata kontroll, T2 – mineraalväetis, T3 – käärimisjääk, T4 – veiseläga). OA – orgaaniline aine, NS – niiskusesisaldus, N_K – Kjeldahli lämmastik, P_{LL} – laktaatlahustuv fosfor.

Proov	pH	OA (%)	NS (%)	N _K (%)	P _{LL} (mg kg ⁻¹)
T1					
1. päev	5,47 (±0,13)	2,74 (±0,15)	18,6 (±1,3)	0,139 (±0,005)	138 (±2)
3. päev	5,70 (±0,03)	2,85 (±0,25)	17,8 (±0,8)	0,148 (±0,010)	138 (±7)
47. päev	6,02 (±0,41)	3,10 (±0,19)	9,5 (±4,3)	0,158 (±0,013)	149 (±13)
49. päev	5,74 (±0,15)	2,98 (±0,17)	13,5 (±1,2)	0,151 (±0,014)	144 (±10)
96. päev	5,66 (±0,07)	3,20 (±0,15)	9,5 (±0,3)	0,165 (±0,007)	138 (±2)
98. päev	5,70 (±0,13)	3,19 (±0,16)	9,7 (±0,9)	0,161 (±0,009)	139 (±1)
126. päev	5,69 (±0,07)	3,46 (±0,17)	12,0 (±0,6)	0,164 (±0,009)	148 (±1)
152. päev	5,62 (±0,11)	3,08 (±0,17)	15,3 (±0,3)	0,161 (±0,006)	137 (±5)
T2					
1. päev	5,37 (±0,05)	2,78 (±0,14)	18,6 (±0,5)	0,140 (±0,003)	140 (±6)
10. päev	5,49 (±0,06)	2,77 (±0,03)	17,8 (±0,7)	0,144 (±0,002)	134 (±7)
47. päev	5,66 (±0,04)	2,96 (±0,11)	9,5 (±1,7)	0,152 (±0,002)	139 (±6)
49. päev	5,52 (±0,11)	3,03 (±0,15)	13,4 (±0,7)	0,152 (±0,013)	133 (±11)
96. päev	5,47 (±0,07)	3,28 (±0,18)	8,6 (±0,3)	0,173 (±0,006)	136 (±24)
98. päev	5,39 (±0,03)	3,47 (±0,07)	8,6 (±0,4)	0,176 (±0,010)	126 (±6)
126. päev	5,76 (±0,85)	3,31 (±0,02)	11,1 (±0,9)	0,160 (±0,006)	135 (±5)
152. päev	5,36 (±0,03)	3,09 (±0,12)	14,2 (±0,1)	0,164 (±0,001)	122 (±6)
T3					
1. päev	5,69 (±0,25)	2,72 (±0,02)	19,2 (±0,9)	0,133 (±0,001)	142 (±10)
10. päev	5,68 (±0,36)	2,92 (±0,31)	17,2 (±0,6)	0,160 (±0,013)	154 (±18)
47. päev	5,73 (±0,32)	2,94 (±0,13)	10,4 (±2,3)	0,150 (±0,008)	152 (±19)
49. päev	5,90 (±0,20)	3,12 (±0,11)	14,9 (±1,2)	0,161 (±0,008)	165 (±8)
96. päev	6,17 (±0,27)	3,58 (±0,31)	8,5 (±1,1)	0,183 (±0,014)	177 (±21)
98. päev	6,21 (±0,14)	3,43 (±0,30)	9,7 (±0,9)	0,176 (±0,010)	172 (±8)
126. päev	6,19 (±0,20)	3,31 (±0,18)	10,9 (±0,6)	0,172 (±0,012)	180 (±13)
152. päev	6,12 (±0,19)	3,30 (±0,08)	14,9 (±0,4)	0,172 (±0,007)	172 (±13)
T4					
1. päev	5,58 (±0,13)	2,78 (±0,12)	17,8 (±1,1)	0,142 (±0,009)	147 (±15)
3. päev	6,03 (±0,65)	2,80 (±0,09)	19,5 (±0,0)	0,152 (±0,007)	145 (±14)
47. päev	5,87 (±0,15)	2,93 (±0,23)	10,7 (±1,1)	0,149 (±0,007)	146 (±13)
49. päev	6,15 (±0,23)	3,25 (±0,17)	15,1 (±0,5)	0,161 (±0,006)	171 (±10)
96. päev	6,01 (±0,09)	3,52 (±0,37)	8,9 (±0,1)	0,185 (±0,011)	174 (±13)
98. päev	6,19 (±0,06)	3,74 (±0,23)	10,1 (±0,3)	0,183 (±0,013)	186 (±12)
126. päev	6,10 (±0,03)	3,45 (±0,28)	12,0 (±0,5)	0,175 (±0,007)	184 (±14)
152. päev	6,06 (±0,04)	3,41 (±0,25)	15,8 (±0,7)	0,178 (±0,009)	177 (±4)

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kärt Kanger,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Käärimisjäägi mõju põllumajandusliku rohumaa mulla antibiootikumresistentsusgeenide sisaldusele“, mille juhendajad on Hiie Nõlvak ja Jaak Truu,
 - 1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **19.05.2015**